PROTEINE DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI
CHARAKTERISIERUNG DES λ–REZEPTORS UND UNTERSUCHUNGEN ZUR RÄUMLICHEN ANORDNUNG DER HAUPTPROTEINE IN DER MEMBRAN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard–Karls–Universität Tübingen

vorgelegt von
Rainer Endermann
aus Herne

1979

79 94

PROTEINE DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI
CHARAKTERISIERUNG DES λ–REZEPTORS UND UNTERSUCHUNGEN ZUR RÄUMLICHEN ANORDNUNG DER HAUPTPROTEINE IN DER MEMBRAN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard–Karls–Universität Tübingen

vorgelegt von
Rainer Endermann
aus Herne

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	15. Februar 1979
Dekan:	Professor Dr. F. Oberwinkler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. U. Henning
2. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Braun

Herrn Prof. Dr. U. Henning gilt mein besonderer Dank für das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse und für seine zahlreichen wertvollen Ratschläge. Herrn Dr. R. Chen möchte ich für die Durchführung der Aminosäure-Analysen und Frau I. Haar für die Durchführung des Edman-Abbaus danken. Frau U. Hieke danke ich für die Fertigstellung des Manuskripts, Herrn E. Freiberg für das Zeichnen der Schaubilder und Herrn Dr. H. Schwarz für das Anfertigen der Photographien. Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Stipendiums.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0035

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1.	Chemikalien, Enzyme und Medien	12
2.2.	Bakterienstämme und Aufzuchtbedingungen	13
2.3.	Präparative Methoden	15
2.3.1.	Zentrifugationen	15
2.3.2.	Präparation von Zellhüllen	16
2.3.2.1.	"Alcoa"-Hüllen	16
2.3.2.2.	Glasperlenhüllen	16
2.3.2.3.	Ultraschallhüllen	17
2.3.3.	Reinigung des λ-Rezeptorproteins	17
2.3.3.1.	Pronase-Verdauung der "Alcoa"-Hüllen	17
2.3.3.2.	SDS-EDTA-Extraktion	18
2.3.3.3.	Gelfiltration an einer Bio-Gel P-200-Säule	19
2.3.4.	Perameisensäure-Oxidation	20
2.3.5.	Reduktion und S-Carboxymethylierung	21
2.3.6.	Quervernetzung von Zellhüllen	21
2.3.7.	SDS-Extraktion quervernetzten Materials	22
2.3.8.	Lysozym-Verdauung quervernetzter Hüllen nach SDS-Extraktion	22
2.3.9.	Gewinnung der periplasmatischen Proteine	23
2.3.10.	Fluorescamin-Markierung:	23
2.3.10.1.	ganzer Zellen	23
2.3.10.2.	von Glasperlenhüllen	24

		Seite
2.3.10.3.	der periplasmatischen Proteine	24
2.3.11.	Präparation von Fluorescamin-markierten Phospholipidvesikeln	25
2.3.12.	Trennung der inneren und äußeren Membran	25
2.3.13.	Extraktion der Phospholipide	26
2.3.14.	Tryptische Verdauung Fluoreszenz-markierter Glasperlenhüllen	26
2.4.	Analytische Methoden	27
2.4.1.	Inaktivierung des Phagen λ durch Membranfraktionen	27
2.4.2.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen (-PAGE)	28
2.4.2.1.	Röhrchengel-Elektrophoresen	28
2.4.2.2.	Plattengel-Elektrophoresen	28
2.4.2.3.	Molekulargewichtsbestimmung durch Plattengel-Elektrophorese	29
2.4.3.	Aminosäureanalyse nach Hydrolyse:	30
2.4.3.1.	mit Salzsäure	30
2.4.3.2.	mit Methansulfonsäure	30
2.4.4.	Anfertigung der tryptischen "Fingerprints"	31
2.4.5.	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz	32
2.4.6.	Proteinbestimmung	32
2.4.7.	LPS-Bestimmung: Messung des 2-Keto-3-desoxyoctanoat-Gehalts	34
2.4.8.	Auftrennung der Phospholipide	34
2.4.9.	Radioaktivitätsmessung:	34
2.4.9.1.	in wässrigen Proben	34
2.4.9.2.	in Chloroform/Methanol-Extrakten	35
2.4.9.3.	in SDS-Polyacrylamidgelen	35

		Seite
2.4.9.4.	von markierten Flecken auf Dünnschicht -Chromatogrammen	35
3.	ERGEBNISSE	36
3.1.	Charakterisierung des λ-Rezeptorproteins	36
3.1.1.	Identifizierung des λ-Rezeptorproteins (lam B-Genprodukts)	36
3.1.2.	Isolierung des Rezeptorproteins	38
3.1.3.	Proteinchemische Untersuchungen des Rezeptormoleküls	43
3.1.3.1.	Aminosäurezusammensetzung	43
3.1.3.2.	Alkylierung mit Jod [1-^{14}]-Acetamid	46
3.1.3.3.	Tryptischer "Fingerprint"	46
3.1.3.4.	N-terminale Sequenz	48
3.2.	Untersuchung der Struktur der äußeren Membran mit Hilfe von Quervernetzung	49
3.2.1.	Protein-Protein- und Protein-Murein-Wechselwirkungen	51
3.2.2.	Nachweis der direkten Verknüpfung des Proteins II* ans Murein	56
3.2.3.	Bestimmung des Lipopolysaccharid- und Phospholipidgehalts in den Membranfraktionen nach Quervernetzung und SDS-Extraktion	59
3.3.	Untersuchung der Orientierung der Membrankomponenten in der äußeren Membran mit Hilfe von Fluorescamin-Markierung	65
3.3.1.	Markierung von ganzen Zellen und Glasperlenhüllen	67

		Seite
3.3.2.	Identifizierung der Hauptfluoreszenzbande als markiertes Phosphatidyläthanolamin	69
3.3.3.	Versuche zum Nachweis der Oberflächenspezifität der Fluorescamin-Markierung	71
3.3.4.	Lokalisierung der Fluoreszenz-Markierung im Protein II*-Molekül	75
3.3.5.	Das Protein II* als mögliche Eintrittsstelle für das Fluorescamin	76
4.	DISKUSSION	78
4.1.	Das λ-Rezeptorprotein	78
4.2.	Vergleich des λ-Rezeptorproteins mit den Proteinen Ia/Ib	80
4.3.	Nachbarschaftsbeziehungen in der äußeren Membran	83
4.4.	Die transmembrane Anordnung des Proteins II*	88
4.5.	Die Fluorescamin-Markierungsversuche	89
5.	ZUSAMMENFASSUNG	94
6.	LITERATURVERZEICHNIS	98
7.	ABKÜRZUNGEN	105

1. Einleitung

Der Aufbau der Zellhülle

Die Zellhülle von Escherichia coli besteht wie bei allen gramnegativen Bakterien aus drei Schichten (1,2): Zwischen zwei Membranstrukturen, der inneren oder Cytoplasmamembran und der äußeren Membran, befindet sich die Mureinschicht (auch Peptidoglykan oder Mucopeptid genannt). Die äußere Membran und die Mureinschicht sind über das Lipoprotein fest miteinander verbunden (3). Diese aus den zwei Schichten gebildete Grenzfläche wird als Zellwand bezeichnet. Zwischen der Zellwand und der Cytoplasmamembran liegt ein extrazelluläres Kompartiment, der periplasmatische Raum, der hydrolytische Enzyme und Bindeproteine für verschiedene Nährstoffe enthält (4). Als Adhäsionszonen (5) werden Regionen bezeichnet, wo die äußere und die Cytoplasmamembran in direktem Kontakt miteinander stehen. Die letztere durchdringt dabei die Mureinschicht.

Die Funktion und Struktur der Schichten der Zellhülle

Die Cytoplasmamembran, die Hauptpermeabilitätsbarriere der Zelle, enthält die Enzymsysteme der Atmungskette (6), der oxidativen Phosphorylierung (6,7), des aktiven Transports (7,8) und der Biosynthese der Phospholipide (9,10)

und der Zellwandpolymere (11,12). Das von Singer & Nicolson (13) für den Aufbau von Membranen vorgeschlagene "fluid mosaic"-Modell beschreibt sicherlich am besten die Struktur der inneren Membran. Das Grundgerüst der Membran bildet eine Phospholipiddoppelschicht mit schwächer gebundenen peripheren Proteinen und fest verankerten integralen Membranproteinen.

Die Hauptaufgabe der nach außen hin folgenden Mureinschicht sind der osmotische Schutz und eine unterstützende Funktion bei der Aufrechterhaltung der Zellform. Die Grundstrukturen der Peptidoglykanschicht sind Aminozuckerketten, die über Peptidbrücken verknüpft sind (14,15).

Die äußerste Schicht, die äußere Membran, ist eine Diffusionsschranke für größere Oligopeptide (16), neutrale Zucker mit einem Molekulargewicht >700 (17,18) sowie hydrophobe Farbstoffe und Antibiotika (19). Kleinere hydrophile Moleküle, wie z.B. Glucose und Aminosäuren können dagegen über unspezifische Diffusionsporen permeiren (20,21). Daneben besitzt sie für verschiedene Nährstoffe wie z.B. Eisen (22,23), Vitamin B_{12} (24,15) und Maltose bzw. Maltodextrine (26,27) spezifische Aufnahmesysteme. In der äußeren Membran sind auch die Rezeptoren für Bakteriophagen (28,29,30) und Colicine (23,24,31) lokalisiert. An der Ausbildung des Septums bei der Zellteilung (32,33) und am Vorgang der Konjugation

(34,35) ist sie ebenfalls beteiligt. Das bisher einzige mit Sicherheit in der äußeren Membran nachgewiesene Enzym ist die Phospholipase A (9,10). Daneben haben vor einiger Zeit Inouye & Beckwith (36) nach dem Isolieren der einzelnen Schichten der Zellhülle eine proteolytische Aktivität in Verbindung mit der äußeren Membranfraktion gefunden. Die Membranmorphologie ist, wie Gefrierbruchaufnahmen zeigen, anders als die der Cytoplasmamembran (37). Auch weist sie gegenüber der letzteren eine veränderte molekulare Zusammensetzung auf. Die äußere Membran enthält weniger Phospholipid und eine geringere Zahl verschiedener Proteine (8,38), von denen allerdings einige wenige in hohen Konzentrationen vorkommen (10^5 - 7.5×10^5 Moleküle/Zelle) und daher Hauptproteine genannt werden. Weiterhin besitzt sie als charakteristische Komponente das Lipopolysaccharid (LPS) (8,38).

Die Bestandteile der äußeren Membran:

Die Proteine

Die zahlreichen Funktionen, die die äußere Membran erfüllt, verdeutlichen, daß sie für das Bakterium mehr ist als nur eine schützende und formstabilisierende Hülle. Sie stellt die Kommunikationsfläche des Organismus mit seiner Umgebung dar. Die bereits erwähnten Hauptproteine sind vermutlich an allen Wechselwirkungen mit der Umwelt maßgeblich beteiligt. Die Tatsache, daß sie in großer Menge vorhanden sind, erleichterte ihre Isolierung und Charakteri-

sierung, nachdem es zuerst Miura & Mizushima (6) gelungen war, die innere und die äußere Membran mit Hilfe der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation zu trennen. Aus historischen Gründen existieren für die Hauptproteine verschiedene Nomenklaturen. In der vorliegenden Arbeit wird die von Henning (39,40) eingeführte verwendet. Di Rienzo et al. (41) haben kürzlich alle bekannten Nomenklaturen zusammengestellt und die Hauptproteine in Bezug zueinander gesetzt.

Das in SDS-Polyacrylamid-Gelsystemen am schnellsten wandernde Hauptprotein ist das Lipoprotein, dessen chemische Struktur von Braun und Mitarbeitern aufgeklärt worden ist (42,43,44). Neben dem Murein-gebundenen Lipoprotein kommt eine doppelt so große Menge des Proteins in freier Form in der äußeren Membran vor (44,45,46). Eine Zelle enthält 2.5×10^5 freie Proteinmoleküle. Die Gesamtmenge beträgt demnach um 7.5×10^5 Lipoprotein-Exemplare pro Zelle, womit dieses Protein auf molarer Basis das häufigste ist. Das freie Lipoportein ist der biosynthetische Vorläufer der Murein-gebundenen Form (48). Der Befund, daß nur in E.coli-Mutanten, die ein defektes LPS besitzen, Antilipoproteinserum mit dem Protein reagiert (49), deutet darauf hin, daß das Lipoprotein in Wildtyp-Zellen nach außen hin von anderen Membrankomponenten verdeckt wird. Das Auftreten von Lipoproteindimeren in den Zellhüllen einer E.coli-Mutante, deren Lipoprotein statt des Arginin in Position 57 ein Cystein besitzt (50),

zeigt, daß die Lipoprotein-Moleküle in der äußeren Membran in enger Beziehung zueinander stehen. Die Funktion des Lipoproteins ist noch weitgehend ungeklärt. Hirota et al. (51) fanden eine Mutante, der das Lipoprotein gänzlich fehlt. Die defekten Zellen sind überempfindlich gegenüber EDTA und durchlässig für die periplasmatische RNase, bezüglich der Zellteilung und der Zellmorphologie sind sie aber normal. Diese Eigenschaften weisen auf eine Aufgabe des Lipoproteins bei der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der äußeren Membran hin. Yem & Wu (52) kommen nach ihren Untersuchungen an einer E.coli-Mutante, die die Murein-gebundene Form in reduzierter Menge enthält, für das gebundene Lipoprotein zu dem gleichen Ergebnis. Die strukturelle Bedeutung der gebundenen Form zeigen auch die Ergebnisse der von Yamada & Mizushima (53) durchgeführten Rekonstitutionsexperimente. Die Gegenwart des gebundenen Lipoproteins ist für die Bildung einer Gitterstruktur aus Protein Ib bzw. Ia und LPS auf der Peptidoglykanschicht notwendig.

Außer den Ergebnissen einer proteinchemischen Charakterisierung (54) sind vom Protein III keine weiteren Daten bekannt. Der Mangel an Kenntnis bezüglich der Funktionen dieses Hauptproteins hat seinen Grund darin, daß bisher noch keine Mutante beschrieben worden ist, der dieses Protein fehlt.

Das Protein II* besitzt zwei charakteristische Eigenschaften, durch die es sich von den anderen Hauptproteinen

unterscheidet. Behandelt man Zellhüllen mit Trypsin oder Pronase, so wird es teilweise abgebaut (55). Daneben zeigt es als zweite Besonderheit ein Verhalten, das in der Literatur mit "heat-modifiability" bezeichnet wird. Seine elektrophoretische Beweglichkeit im SDS-Gelsystem verringert sich, wenn man die Membranpräparation in Gegenwart von SDS kocht. Sein scheinbares Molekulargewicht beträgt in diesem Fall 33 000, während es bei 28 000 liegt, wenn man die Membranproteine in gleicher Weise, aber ohne Kochen in Lösung bringt (55). Ein Teil des Proteins II* muß an der Zelloberfläche liegen, da es als Phagenrezeptor dient (29,34). Untersuchungen an Mutanten, denen das Protein fehlte (56,57), sowie die Hemmung der Konjugation durch isoliertes Protein (35) beweisen eindeutig eine Beteiligung des Proteins II* an diesem Prozeß. Eine Wechselwirkung zwischen dem Protein und dem LPS scheint in vivo vorhanden zu sein (29,35,55).

Die Proteine Ia und Ib der äußeren Membran sind durch ihre feste, aber nicht kovalente Bindung an die Mureinschicht gekennzeichnet(58). Wenn man Zellhüllen mit SDS bei 60°C behandelt, so findet man sie neben der gebundenen Form des Lipoproteins als einzige Hauptproteine im unlöslichen Material (58). Nur durch Kochen in Gegenwart von SDS (58) oder durch Extraktion mit einer SDS-Lösung, die 0.5M an Natriumchlorid ist (59) kann man sie von der Peptidoglykanschicht ablösen. Das Auftreten der Proteine in der äußeren Membran ist stammspezifisch: B-Stämme

besitzen nur Protein Ia, während in K-12-Stämmen beide Proteine vorkommen (60). Die relative Menge der beiden Proteine in der Membran ist von der Zusammensetzung des Nährmediums abhängig (61,62). Ichihara & Mizushima (63) zeigten, daß die aus einem K-12-Stamm isolierten und gereinigten Proteine trotz gewisser proteinchemischer Ähnlichkeiten Produkte zweier verschiedener Strukturgene sind. Die Anordnung des Proteins Ia in der Membran eines E.coli B-Stammes wurde von Steven et al. (64) elektronenmikroskopisch untersucht. Die Proteinmoleküle bedecken zu 60% die Mureinschicht in Form eines hexagonalen Gitters. Das Grundelement der Gitterstruktur bilden drei Proteinmoleküle, die zu einer Einheit zusammengefaßt sind. Die Tatsache, daß die periodische Struktur auch in Abwesenheit der Mureinschicht vorhanden ist, läßt auf starke Protein-Protein-Wechselwirkungen als stabilisierende Kräfte schließen. Die Polypeptidketten durchdringen die gesamte äußere Membran, da Bakteriophagen die Proteine Ia und Ib als Rezeptormoleküle benutzen (29, 65,66). In vitro-Untersuchungen (67) und Studien an Mutanten, denen die Proteine fehlen (20), haben ergeben, daß sie eine Porenfunktion für hydrophile Substanzen mit einem Molekulargewicht von <700 ausüben.

Neben den permanent vorhandenen Hauptproteinen gibt es auch noch induzierbare Proteine, die bei bestimmten Wachstumsbedingungen in hoher Konzentration in der äußeren Membran auftreten. Einige dieser Proteine spielen bei der Aufnahme von Nährstoffen eine Rolle. Ein Teil von

ihnen dient außerdem Bakteriophagen und Colicinen als Rezeptor. In (41) sind alle bisher beschriebenen induzierbaren Proteine mit ihren Funktionen und Rezeptoreigenschaften aufgeführt. Zu dieser Gruppe gehört auch das lam B-Genprodukt, das Rezeptorprotein für den Phagen λ (28). Das lam B-Gen liegt im mal B-Operon (68). Die Synthese des Proteins wird durch Maltose induziert. Voll induzierte Zellen enthalten etwa 10^5 Rezeptormoleküle in ihrer äußeren Membran (27). Die transmembrane Diffusion von Maltose und Maltodextrinen wird durch das lam B-Protein erleichtert (69). In Mutanten, die das Protein enthalten, denen aber die Proteine Ia und Ib fehlen, verläuft die Diffusion von Glucose und Laktose über die äußere Membran schneller als in Zellen, denen es fehlt (70). Diese Ergebnisse zeigen, daß das lam B-Protein eine Porenfunktion erfüllt.

Die Lipidkomponenten

Die Proteine sind in der Doppelschicht-Struktur (1) der äußeren Membran als die Funktionsträger an die aus LPS und Phospholipiden bestehende Lipidmatrix geheftet oder in ihr verankert. Das LPS ist in der Doppelschicht asymmetrisch verteilt (38,71). Seine Lipid A-Region, bei der es sich um ein acyliertes Diglucosamin mit Lipidcharakter handelt, ersetzt zum großen Teil die Phospholipide im äußeren Teil der Doppelschicht. Neben dem Lipid A-Bereich ist das LPS noch aus zwei weiteren Regionen aufgebaut: dem O-Antigen-Bereich, der für Antigen-Eigenschaften der Bakterienzelle verantwortlich ist und das Kernpoly-

saccharid, welches durch die seltene Zuckerkomponente 2-Keto-3-desoxyoctanoat (KDO) gekennzeichnet ist (14). Die Polysaccharidketten des LPS ragen nach außen (38).

Die innere Hälfte der Membran enthält als Lipidkomponente die Phospholipide (38). 70-80% des Gesamtphospholipids liegen als Phosphatidyläthanolamin vor. Der Anteil am Phosphatidylglycerin und Cardiolipin beträgt jeweils zwischen 5 und 15% (72,73).

Die Architektur der äußeren Membran

Bezüglich der räumlichen Anordnung der Komponenten in der äußeren Membran und nachbarschaftlicher Beziehungen zwischen ihnen liegen noch keine endgültigen Ergebnisse vor. Bei der Beschreibung der Proteine in den vorangehenden Abschnitten werden an mehreren Stellen Wechselwirkungen zwischen Membranbestandteilen beschrieben, die man unter anderem durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (64) und durch Rekonstitutionsexperimente (53) erhalten hat. Die Verwendung von Quervernetzungsreagenzien ist eine weitere Möglichkeit, um Aussagen über die Organisation der äußeren Membran machen zu können. Haller & Henning (74) haben Dimethylimidoester benutzt, um Protein-Protein-Wechselwirkungen in Zellhüllen von E.coli zu erforschen. Sie fanden, daß ausgiebige Wechselwirkungen in der gesamten Fläche der äußeren Membran vorkommen, denn die Quervernetzungsbehandlung führte zur Verknüpfung aller Hauptproteine und eines Teils des Phospholipids. Diese Unter-

suchung gab aber keine Auskunft über spezielle Nachbarschaftsbedingungen individueller Membrankomponenten. Erst die Verwendung der in jüngerer Zeit erhältlichen spaltbaren Vernetzungsreagenzien lieferte Informationen über spezifische Wechselwirkungen (75,76,77).

Fragestellungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im wesentlichen zwei Probleme bearbeitet. Die erste Frage hatte ihren Ausgangspunkt in der funktionellen Ähnlichkeit des lam B-Proteins mit den Proteinen Ia und Ib. Eine weitere Gemeinsamkeit ist ihre Eigenschaft, daß sie fest an die Mureinschicht gebunden bleiben, wenn man Zellhüllen unter milden Bedingungen mit SDS extrahiert (I:58, lam B:78). Dies ließ daran denken, daß den drei Proteinen eine gemeinsame Struktur zugrunde liegt. Da bisher noch keine proteinchemischen Daten vom λ-Rezeptorprotein bekannt waren, wurde ein Verfahren zu seiner Isolierung ausgearbeitet und das Protein soweit charakterisiert, daß ein Vergleich mit bereits veröffentlichten Ergebnissen der Proteine Ia und Ib möglich war.

Die zentrale Frage des zweiten Problemkreises war: Wie sind die Komponenten in der äußeren Membran räumlich angeordnet? Bis auf die Ergebnisse der bereits erwähnten Quervernetzungsstudien (75,76,77) ist nichts über Nachbarschaftsbeziehungen bekannt. Bei einer der Untersuchungen

(76), die etwas detailliertere Wechselwirkungen beschreibt, ist es zudem fraglich, in wieweit die dargestellten Anordnungen echt sind, da versäumt wurde, den Gehalt der vernetzten Produkte an LPS und Phospholipid zu prüfen. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe eines spaltbaren Quervernetzers und unter Verwendung von Mutanten, denen jeweils ein Hauptprotein fehlt, Nachbarschaftsbeziehungen zwischen diesen Proteinen unter Berücksichtigung aller Membranbestandteile studiert. Zum Schluß wurde versucht, eine noch immer ungeklärte Frage der Membranarchitektur zu lösen. Ist das Phospholipid in der äußeren Membran tatsächlich, wie in (38) vorgeschlagen wird, asymmetrisch, nur auf die innere Hälfte der Membran verteilt?

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Enzyme und Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen wurden von folgenden Herstellern und Lieferanten bezogen:

Aluminiumoxid (Alcoa, Aluminia A-305) von Alcoa Deutschland GmbH (Frankfurt);
2,6-Diaminopimelinsäure-^{3}H(G)-Dihydrochlorid (TRA.76), Jod [1-^{14}C]-Acetamid (CFA.326) und Phosphor-32 (PBS.1) von Amersham Buchler (Braunschweig);
Serum-Albumin vom Rind (reinst.) von Behringwerke AG (Marburg-Lahn);
Bio-Gel P-200 (100-200 mesh) von Bio-Rad Laboratories (Richmond, California, USA);
Eichproteine (Combithek, Größe 1) und Lysozym von Boehringer (Mannheim);
Bromo Phenol Blue von Canalco (Bethesda, Md., USA);
Antibiotic Medium No. 3, Bacto Agar und Nutrient Broth von Difco Laboratories (Detroit, Mich., USA);
Acrylamid, Diäthylsulfat, B, C-Dimyristyroyl-L-A-Phosphatidyl-Äthanolamin, 2-Mercaptoäthanol und Phenylisothiocyanat von Fluka AG (Buchs, Schweiz);
3-(2-Aminoäthyl)-Indol-Hydrochlorid und Methansulfonsäure von Eastman Kodak Co. (Rochester, N.Y., USA);
Penicillin G von Hoechst (Frankfurt);
Omnifluor von NEN Chemicals GmbH (Frankfurt);
Protosol von New England Nuclear (Boston, Mass., USA);
Dithiobis (Succinimidyl Propionat) und Ninhydrin von

Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill., USA);
Silicon-Antischaumemulsion von C. Roth (Karlsruhe);
Coomassie Brilliant Blue, Desoxyribonuklease (aus dem Rinderpankreas), Harnstoff ("ultra pure") und Sucrose ("ultra pure") von Schwarz/Mann (Orangeburg, N.Y., USA);
Fluorescamin (Fluram p.A.), Natriumdodecylsulfat (reinst., salzfrei), Pronase (P, reinst.) und Trypsin (vom Rind, TPCK behandelt) von Serva Feinbiochemica (Heidelberg);
L-α-Phosphatidyl-D,L-Glycerin (aus Eilecithin) von Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA);
Unisolve 1 von W. Zinsser (Frankfurt).

Die übrigen, hier nicht aufgeführten Substanzen, waren Erzeugnisse größtmöglicher Reinheit der Merck AG (Darmstadt). Alle Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt.

2.2. Bakterienstämme und Aufzuchtbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten E.coli K-12-Abkömmlinge sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Als Medium für die Stämme pop1730, P400, P400 1.3, P530, JE5505, JE5506, aro D352 und aro D^+352 diente Antibiotic Medium No. 3 (17.5g/l H_2O).

Zur Markierung des Phospholipids mit ^{32}P wuchsen JE5506, JE5505 und P400 in Nutrient Broth (8g/l H_2O) unter Zusatz

Tabelle 1: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp[x)]	Herkunft (Referenz)
HfrG6	his, λ^s	W. Boos (68)
pop1730	wie HfrG6, aber mal$^-$, λ^r(Deletion mal K-lamB)	W. Boos (80)
P400	thi, thr, leu, argE, proA, str, non, mtl, xyl, ara, galK, lacY, supE	P. Reeves (56)
P400 1.3	wie P400, aber ompA (II^{*-})	hiesige Sammlung
P530	wie P400, aber ompB (Ia$^-$/Ib$^-$)	P. Reeves (81)
JE5506	pps, his, proA, argE thi, gal, lac, xyl, mtl, tsx	Y. Hirota (51)
JE5505	wie JE5506, aber lpo (ohne Lipoprotein)	Y. Hirota (51)
aro D352	aro D	H.U. Schairer (82)
aro D$^+$352	wie aro D352, aber aro D$^+$, lpo; das lpo-Merkmal wurde mit Hilfe des Phagen P1 in den aro D352-Stamm transduziert.	hiesige Sammlung

x)Die genetische Nomenklatur ist die von Bachman et al. (83).

von 0.4% Glucose sowie 0.5% Natriumchlorid und Phosphor-32 (3.33 µCi/ml Medium; spezifische Aktivität des Mediums: 1.5 Ci/Mol PO_4). Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Lysin-auxotrophe Mutante des Stammes JE5505 wurde zur Markierung des Mureins in Antibiotic Medium No. 3 (17.5g/ 1 H_2O) unter Zusatz von unmarkierter (4 g/ml Medium) sowie ^3H-markierter (1 µCi/ml Medium) Diaminopimelinsäure gezogen.

Die Aufzucht erfolgte jeweils unter konstanter Belüftung bei 30°C in 1 l-Flaschen, die mit 750 ml Medium gefüllt waren. Dem Medium wurden immer einige Tropfen Silicon-Antischaumemulsion zugesetzt. Nach vierstündigem Wachstum wurden die Zellen in der späten logarithmischen Phase geerntet (5-8x10^8 Zellen/ml Medium).

HfrG6-Zellen wurden in tiefgefrorenem Zustand von Merck (Darmstadt) bezogen, wo sie in einem Minimalmedium (79) mit 2% Maltose als einziger Kohlenstoffquelle bei konstanter Belüftung gewachsen waren.

2.3. Präparative Methoden

2.3.1. Zentrifugationen

Alle Zentrifugationen bis 40 000xg wurden in einer Sorvall Superspeed RC2-B Kühlzentrifuge ausgeführt. Für die Ultrazentrifugationen mit einer g-Zahl von über 40 000 standen zwei Beckman Ultrazentrifugen zur Verfügung. Es

wurde entweder das "spinco L-2"- oder das "L-65"-Modell benutzt.

2.3.2. Präparation von Zellhüllen

2.3.2.1. "Alcoa"-Hüllen

Die Zellhüllen wurden nach der in (79) beschriebenen Methode hergestellt. Dabei wurden die Zellen in Gegenwart von Aluminiumoxid ("Alcoa") aufgeschlossen. Das Al_2O_3 und die unzerstörten Zellen wurden durch zweimaliges Zentrifugieren entfernt. Anschließend wurde der Zellaufschluß mit Desoxyribonuklease verdaut. Danach wurden die Zellhüllen abzentrifugiert und einmal mit Trispuffer gewaschen.

2.3.2.2. Glasperlenhüllen

Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden ($\sim 2 \times 10^8$ Zellen/ml), wurden abzentrifugiert (10 Min. bei 10 000xg). Das Zellsediment wurde mit H_2O resuspendiert (6 ml pro g Zellsediment) und mit Glasperlen (5g pro 7 ml Zellsuspension; Ø der Glasperlen: 0.17-0.18 mm; Braun-Apparatebau, Melsungen) 2,5 Min. im Zellhomogenisator MSK (Braun - Apparatebau, Melsungen) geschüttelt. Der Homogenisator wurde während des Schüttelvorgangs alle 30 Sek. für 5 Sek. mit flüssigem CO_2 gekühlt. Die Glasperlen wurden anschließend

auf einer Glasfritte abfiltriert und das Filtrat mit H_2O auf ein Volumen von 20 ml pro g Zellsediment verdünnt. Es folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 4000xg. Nachdem durch das Zentrifugieren die unzerstörten Zellen entfernt worden waren, wurden die im Überstand befindlichen Zellhüllen durch eine weitere Zentrifugation (30 Min. bei 40 000xg) sedimentiert. Durch zweimaliges Waschen mit H_2O wurden die Zellhüllen weiter gereinigt.

2.3.2.3. Ultraschallhüllen

Frisch geerntete Zellen (10 minütige Zentrifugation bei 10 000xg) von fünf 10 ml-Kulturen (Zellzahl: $5x10^8$ Zellen/ml) wurden mit 6 ml H_2O resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend 4x30 Sek. im Eisbad beschallt (Sonifier, Stellung 7, 5-6 Ampere; Branson Instruments, Inc.; Stamford, Connecticut, USA). Danach wurden durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 4000xg die unzerstörten Zellen entfernt. Die Zellhüllen wurden anschließend sedimentiert (30 Min. bei 40 000xg) und noch zweimal mit H_2O gewaschen.

2.3.3. Reinigung des λ-Rezeptorproteins

2.3.3.1. Pronase-Verdauung der "Alcoa"-Hüllen

Lyophilisierte "Alcoa"-Hüllen (siehe 2.3.2.1.), die von

gefrorenen HfrG6-Zellen (siehe 2.2.) präpariert worden waren, wurden in 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.5 suspendiert (5 mg/ml). Dieser Suspension wurden 200 µg/ml Pronase zugesetzt. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Pronase-verdauten Hüllen 30 Min. bei 40 000xg abzentrifugiert. Die sedimentierten Hüllen wurden je einmal mit dem oben beschriebenen Puffer und mit H_2O gewaschen. Schließlich wurde das Hüllenmaterial aus H_2O lyophilisiert.

2.3.3.2. SDS-EDTA-Extraktion

Die Pronase-verdauten "Alcoa"-Hüllen wurden mit einem 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.5, der 3% SDS, 5 mM EDTA und 0.1% 2-Mercaptoäthanol enthielt, bei Raumtemperatur homogenisiert (10 mg/ml). Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 30 000xg wurde das Sediment in derselben Weise mit dem halben Volumen der oben beschriebenen Lösung behandelt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die beiden Überstände vereinigt und lyophilisiert. Die trockene Substanz wurde in einem angemessenen Volumen H_2O gelöst. Zu der Lösung wurde Aceton gegeben bis eine Aceton-Endkonzentration von 90% erreicht war. Die Acetonfällung diente der Befreiung des Materials vom SDS. Das resultierende Präzipitat wurde viermal mit Aceton gewaschen (Zentrifugation: 10 Min. bei 8000xg) und schließlich aus H_2O lyophilisiert.

2.3.3.3. Gelfiltration an einer Bio-Gel P-200-Säule

Die mit dem Gel gefüllte Säule (10x100 cm) wurde mindestens 20 Std. mit dem Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.4, der 1 mM EDTA, 1.5% SDS und 0.01% Natriumazid enthielt) äquilibriert. Die Probensubstanz wurde für die Gelfiltration folgendermaßen aufbereitet:

2g des lyophilisierten Materials nach der SDS-EDTA-Extraktion wurden im Elutionspuffer, der aber in diesem Fall 3%ig an SDS war, gelöst (20 mg/ml). Die resultierende Suspension wurde 5 Min. gekocht und danach 1 Std. bei 40 000xg zentrifugiert. Der Oberstand wurde schließlich aufgetragen. Die Durchflußgeschwindigkeit der Säule betrug 25-30 ml/Std. und 8 ml-Fraktionen wurden gesammelt. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde durch Transmissionsmessung bei 280 nm verfolgt (Abb. 1). Von den proteinhaltigen Proben wurde jede dritte der SDS-Röhrchengel-Elektrophorese (siehe 2.4.2.1.) unterworfen. Als Vergleichsprobe wurde auf ein Gel der SDS-EDTA-Extrakt aufgetragen. Die Fraktionen, deren Gele nur die lam B-Proteinbande zeigten, wurden vereinigt. Bis zu einer Aceton-Endkonzentration von 90% wurde Aceton zugesetzt, um die Fraktionen vom SDS zu befreien. Das Präzipitat wurde viermal mit Aceton gewaschen und danach aus H_2O lyophilisiert. Zur weiteren Reinigung wurde das lyophilisierte Rezeptorprotein mit H_2O dest. suspendiert, zentrifugiert (1 Std. bei 40 000xg) und aus H_2O dest. lyophilisiert.

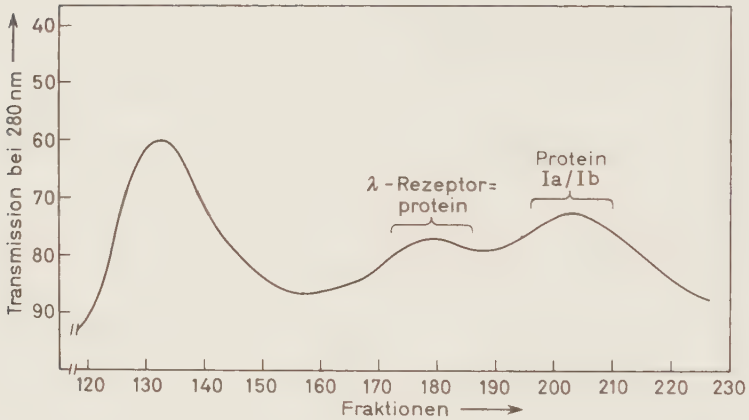

Abb. 1: Chromatographie des im Rahmen der Isolierung des λ-Rezeptorproteins erhaltenen Überstandes nach SDS-EDTA-Extraktion auf Bio-Gel P-200. (ausführliche Erläuterungen in den Abschnitten 2.3.3.3. und 3.1.2.).

2.3.4. Perameisensäure-Oxidation (84)

Perameisensäure wurde durch Zugabe von 1 ml 30%igem Wasserstoffperoxid zu 19 ml 99%iger Ameisensäure hergestellt. Das Gemisch wurde danach 2 Std. im Eisbad gerührt. Nach der Fertigstellung des Reagenzes wurden

10 mg Protein in 0.4 ml kalter 99%iger Ameisensäure gelöst. Dann wurden 0.8 ml Perameisensäure hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 2 Std. im Eisbad gerührt. Anschließend wurde die Perameisensäure nach Zugabe von 5 ml kaltem H_2O durch Lyophilisieren entfernt. Der trockene Rest wurde wieder mit H_2O aufgenommen und ein zweites Mal lyophilisiert.

2.3.5. Reduktion und S-Carboxymethylierung

Die Reduktion und die Alkylierung der Proteine mit Jod [1-^{14}C]-Acetamid, wurde nach der von Crestfield et al. (84) beschriebenen Methode durchgeführt. 34 n Mole des Rezeptorproteins des Phagen λ bzw. 35 n Mole des Proteins I von E.coli B/r (79) wurden mit 10 µCi Amid zur Reaktion gebracht. Die Proteine wurden durch Chromatographie an einer 1x30 cm "Sephadex G50 superfine" (Pharmacia, Uppsala, Schweden)-Säule aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt.

2.3.6. Quervernetzung von Zellhüllen

Bei der Quervernetzung von Glasperlenhüllen mit Dithiobis (Succinimidyl Propionat) wurde die in (76) beschriebene Methode mit einer Veränderung angewandt. Statt nach 30 Sek. wurde die Quervernetzungsreaktion erst nach 1 Min. durch Zugabe einer entsprechenden Menge an 1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8.5 beendet.

2.3.7. SDS-Extraktion quervernetzten Materials

Quervernetzte Proben wurden 3 Min. in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.5, der 2% SDS enthielt und 5 mM an EDTA war, gekocht. Das unlösliche Material wurde durch eine einstündige Zentrifugation bei 50 000xg sedimentiert und einer zweiten Extraktion unterzogen. Der Überstand wurde aufbewahrt und später mit dem Überstand der zweiten Behandlung vereinigt. Die Überstände wurden mit Aceton (90%) gefällt, viermal mit Aceton gewaschen (Zentrifugationen: 10 Min. bei 8000xg) und schließlich aus H_2O lyophilisiert. Durch die Acetonfällung wurde der Überstand vom SDS befreit. Das zweite Sediment wurde noch dreimal mit H_2O gewaschen. Die weitere Behandlung der beiden Fraktionen richtete sich nach der Zielsetzung der folgenden Experimente.

2.3.8. Lysozym-Verdauung quervernetzter Hüllen nach SDS-Extraktion

Nach zweifacher Extraktion quervernetzter Hüllen mit heißer SDS-Pufferlösung wurde das Sediment jeweils noch einmal mit H_2O und einer 0.05 M Ammoniumacetatlösung gewaschen (Zentrifugation: 1 Std. bei 50 000xg). Danach wurde es in 5 ml derselben Lösung suspendiert (das Ausgangsmaterial der Aufarbeitung waren 2.1 g feuchte Zellen). Der Suspension wurde Lysozym (100 µg/ml) zugesetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt. Das Lysozym-verdaute Material wurde 1 Std. bei 50 000xg abzentrifugiert und nach dem Kochen im

Probenpuffer gelelektrophoretisch analysiert.

2.3.9. Gewinnung der periplasmatischen Proteine

Die hydrolytischen Enzyme des periplasmatischen Raumes sowie die Bindeproteine, die am aktiven Transport bestimmter Substanzen beteiligt sind, wurden durch die in (86) beschriebene "Osmotische Schock"-Behandlung mit EDTA freigesetzt. Die gewonnene periplasmatische Fraktion wurde lyophilisiert.

2.3.10. Fluorescamin-Markierung:

2.3.10.1. ganzer Zellen

Frisch geerntete Zellen wurden mit 30 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8.5 plus 1 g/l Glucose, plus 3.5 g/l Natriumchlorid gewaschen. Glucose und NaCl wurden in Anlehnung an das Antibiotic No. 3 Medium, in dem die Zellen gewachsen waren, zugesetzt. Das Zellsediment wurde danach mit demselben Puffer resuspendiert (20 ml/g Zellen). Der Zellsuspension wurden unter kräftigem Rühren 500 µg Fluorescamin/ml Suspension in gelöster Form (40 mg/ml Aceton) zugesetzt. Nach einminütigem Rühren bei Raumtemperatur wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal mit dem Kaliumphosphatpuffer gewaschen.

2.3.10.2. von Glasperlenhüllen

Die H_2O-gewaschenen Hüllen wurden mit dem oben beschriebenen Kaliumphosphatpuffer gewaschen. Das resultierende Sediment wurde mit demselben Puffer resuspendiert (20 ml/g Hüllen). Die anschließende Fluorescaminzugabe war in der Art der Ausführung und der Fluorescaminkonzentration mit der Fluorescaminmarkierung ganzer Zellen identisch. Die Fluorescaminbehandlung wurde auch in diesem Fall durch das Abzentrifugieren der Hüllen und das nachfolgende Waschen mit dem Kaliumphosphatpuffer beendet.

2.3.10.3. der periplasmatischen Proteine

Die lyophilisierte periplasmatische Fraktion (siehe 2.3.9.) von 1 g Zellen (Feuchtgewicht) wurde mit 10 ml des beschriebenen Kaliumphosphatpuffers resuspendiert. Anschließend wurde wie im Vorhergehenden bereits dargestellt die Fluorescamin-Markierung mit derselben Fluorescamin-Konzentration und mit gleicher Behandlungszeit durchgeführt. Am Ende der Behandlung wurde dem Reaktionsgemisch Aceton bis zu einer Endkonzentration von 90% zugesetzt, um die markierten Proteine auszufällen. Es folgte eine Zentrifugation (10 Min. bei 8000xg). Das Sediment wurde mit wenig H_2O aufgenommen und lyophilisiert.

2.3.11. Präparation von Fluorescamin-markierten Phospholipidvesikeln

Zu 5 mg Phosphatidyläthanolamin und 100 µl Phosphatidylglycerinlösung (10 mg/ml Chloroform/Methanol (98:2)-Gemisch) wurden 900 µl Chloroform gegeben. Die resultierende Lösung wurde im Stickstoff-Strom getrocknet. Nach Zusatz von 2 ml eines 30 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 8.5 zum Rückstand, wurde die Suspension 20 Min. im Eisbad mit dem Branson Sonifier (Stellung 2, 2 Ampere, siehe auch 2.3.2.3.) beschallt. Die opaleszierende Flüssigkeit wurde anschließend 5 Min. bei 4000xg zentrifugiert. Zum Überstand wurden unter kräftigem Schütteln 50 µl Fluorescaminlösung gegeben (40 mg/ml Aceton). Danach wurde das Gemisch am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit 1 ml Chloroform/Methanol (2:1)-Gemisch aufgenommen.

2.3.12. Trennung der inneren und äußeren Membran

Bei der Auftrennung der Gesamtmembran in innere und äußere Membran wurde die Methode von Ito et al. (87) in leicht modifizierter Form verwendet. Wie eine mikroskopische Überprüfung zeigte, hatten sich die Zellen nach dem halbstündigen Rühren in der eiskalten EDTA-Lysozym-Lösung noch nicht in Sphäroplasten umgewandelt. Aus diesem Grund wurde der Ansatz abweichend von der Vorschrift für eine weitere

halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Auch nach dieser Zusatzbehandlung zeigte sich bei der mikroskopischen Kontrolle nicht die gewünschte Sphäroplasten-Präparation, sondern mehr oder weniger lysierte Zellen, mit denen dann die weitere Aufarbeitung durchgeführt wurde. Die nach Beendigung der Präparation angefertigten SDS-PAGEs dokumentierten, daß auch mit den lysierten Zellen eine Auftrennung in innere und äußere Membran erreicht worden war.

2.3.13. Extraktion der Phospholipide

Lyophilisierte Zellen oder Zellhüllen wurden jeweils zweimal für je drei Stunden mit Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert: Zu je 3 mg des lyophilisierten Materials wurde 1 ml des Lösungsmittelgemisches gegeben. Durch kräftiges Rühren wurde eine homogene Suspension erzeugt. Nach drei Stunden bei Raumtemperatur waren die Zell- oder Zellhüllpartikel als Sediment zu Boden gesunken. Der klare Oberstand wurde abgesaugt. Die Extraktion wurde mit dem Sediment wiederholt. Die beiden Oberstände wurden schließlich vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeengt.

2.3.14. Tryptische Verdauung Fluoreszenz-markierter Glasperlenhüllen

Lyophilisierte Glasperlenhüllen, die mit Fluorescamin

markiert worden waren, wurden mit 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8.5 resuspendiert (10 mg/ml). Pro ml Suspension wurden 200 µg Trypsin zugesetzt. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurde das unverdaute Material abzentrifugiert (30 Min. bei 40 000xg) und je einmal mit dem oben beschriebenen Puffer und mit H_2O gewaschen. Schließlich wurden die Trypsin-behandelten Glasperlenhüllen aus H_2O lyophilisiert.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1. Inaktivierung des Phagen λ durch Membranfraktionen

Ein Milliliter einer Phagensuspension, mit 4000-6000 Plaque-bildenden Einheiten in einer 10 mM Magnesiumsulfatlösung, die 0.02% Rinderserumalbumin enthielt, wurde zu einem Milliliter der in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.5 verdünnten Membranfraktionen gegeben. Die Kontrollansätze enthielten nur Tris-Puffer. Ungefähr 5 Tropfen Chloroform wurden den Inaktivierungsgemischen zugesetzt. Nach kräftigem Schütteln folgte eine Inkubation von halbstündiger Dauer bei 37°C. Anschließend wurde 0.1 ml aus den Ansätzen zu 2.5 ml Weichagar (0.8% Nutrient Broth, 0.5% Natriumchlorid, 0.65% Bacto Agar) pipettiert, der 10^8 Indikatorbakterien enthielt (HfrG6-Zellen, die in Minimalmedium mit Maltose (2%) als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen waren; 79). Dieses Gemisch wurde auf Antibiotic Medium No. 3-Platten (Petrischalen 94.0/16 mm,

Greiner Labortechnik, Nürtingen; 17.5 g Antibiotic Medium No. 3, 15 g Bacto Agar pro 1 H_2O) plattiert. Die Platten wurden 5-6 Std. bei 37°C bebrütet. Die entstandenen Plaques wurden mit dem Modell C100-Zählgerät (New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, N.J., USA) gezählt.

2.4.2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen (-PAGE)

2.4.2.1. Röhrchengel-Elektrophoresen

Die Elektrophoresen wurden wie in (39) beschrieben durchgeführt. Die Proben wurden ausschließlich nach der Methode II aufbereitet. Das Fixieren und Färben der Gele mit Coomassie Brilliant Blue erfolgte wie bei Weber & Osborn (88). Sie wurden elektrophoretisch entfärbt. Die Entfärbelösung hatte folgende Zusammensetzung:

75 ml Eisessig
50 ml Methanol
ad 1 l mit H_2O

2.4.2.2. Plattengel-Elektrophoresen

Die Elektrophoresen wurden in einem von Studier (89) beschriebenen Plattengel-Apparat durchgeführt. Das Sammel- und das Trenngel sowie das Puffersystem wurden bis auf drei Veränderungen nach der Vorschrift von

Laemmli (90) hergestellt. Die Modifikationen waren:

- Statt 0.025% war die N,N,N',N'-Tetramethylendiaminkonzentration 0.15%.
- Die Polyacrylamidkonzentration des Sammelgels wurde von 3% auf 5%, die des Trenngels von 10% auf 12% erhöht.

Nach der Elektrophorese (bei $4^{o}C$ und 12 mA/Plattengel) wurden die Gele ebenfalls nach Weber & Osborn (88) fixiert und gefärbt. Das Entfärben geschah unter Rühren bei Raumtemperatur in der bereits genannten Entfärbelösung.

2.4.2.3. Molekulargewichtsbestimmung durch Plattengel-Elektrophorese (88)

Auf ein Plattengel wurden neben dem Protein mit unbekanntem Molekulargewicht Standardproteine aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die R_f-Werte der Standardproteinbanden berechnet. Trägt man die Logarithmen der Molekulargewichte der Standardproteine gegen ihre R_f-Werte auf, so erhält man eine Gerade. Errechnet man anschließend den R_f- Wert des unbekannten Proteins, so kann man an der Geraden, den Logarithmus seines Molekulargewichts ablesen, aus dem man durch mathematische Umrechnung das Molekulargewicht erhält.

2.4.3. Aminosäureanalyse nach Hydrolyse:

2.4.3.1. mit Salzsäure

400-800 µg Protein wurden mit 0.4-0.8 ml 5.7 N Salzsäure, die 0.2% 2-Mercaptoäthanol enthielt (91), im Vakuum bei 110°C 24, 48 oder 72 Std. hydrolysiert. Die Salzsäure wurde nach Beendigung der Hydrolyse in einem evakuierten Exsikkator über Natriumhydroxid-Plättchen abgedampft. Das trockene Aminosäuregemisch wurde mit 60 µl des Probenpuffers für den Aminosäureanalysator (0.2N Natriumcitratpuffer pH 2.2) aufgenommen. Die Aminosäureanalysen von 10 µl Aliquots wurden mit einem Durrum D-500 Analyzer (Durrum Instr. Corp., Palo Alto, California, USA) durchgeführt.

2.4.3.2. mit Methansulfonsäure (92)

Im Vakuum wurden bei 110°C 1-2 mg Protein mit 1 ml 4 M Methansulfonsäure, die 0.2% 3-(2-Aminoäthyl)Indol enthielt, 24 und 48 Std. hydrolysiert. Am Ende der Hydrolyse wurde das der Säure äquivalente Volumen an 3.5 N Natronlauge zum Hydrolysat gegeben. Mit 0.4 ml Aliquots des Aminosäurengemisches wurden die Analysen mit Hilfe eines Beckman Multichrom B Liquid Column Chromatograph 4255 durchgeführt.

2.4.4. Anfertigung der tryptischen "Fingerprints"

Die tryptische Verdauung und die Auftrennung der Peptide wurde bis auf vier Veränderungen wie in (93) beschrieben durchgeführt. Die Modifikationen waren:

- Anstelle von 1/30 der Proteinausgangsmenge wurde 1/50 an Trypsin zugesetzt.
- Statt einer sechstündigen Inkubation bei 30°C wurde der Ansatz 4 Std. bei 37°C verdaut.
- Die Zusammensetzung des Puffers für die Elektrophorese auf Polygram CEL400 Cellulose-Platten (20x20 cm, Schichtdicke 0.1 mm, Macherey - Nagel & Co., Düren) war

  Pyridin 2 (5)* Volumenteile
  Essigsäure 4 (5) Volumenteile
  Aceton 16 (-) Volumenteile
  H_2O 80 (190) Volumenteile.
- Für die chromatographische Auftrennung wurde folgendes Laufmittel benutzt:

  Pyridin 10 (12)* Volumenteile
  n-Butanol 15 (15) Volumenteile
  Essigsäure 3 (3) Volumenteile
  H_2O 12 (12) Volumenteile

(*in Klammern sind die in der Vorschrift angegebenen Zusammensetzungen aufgeführt).

Nach der Chromatographie wurde die Platte getrocknet. Anschließend wurde sie mit einer Ninhydrinlösung

folgender Zusammensetzung leicht besprüht:

1.5 g Ninhydrin
15 ml Collidin
50 ml Essigsäure
ad 500 ml mit Äthanol.

Danach wurde die Platte 20 Min. bei 65°C getrocknet. Das typische Fleckenmuster zeigte sich erst nach dem Aufbewahren der Platte im Dunkeln am nächsten Tag.

2.4.5. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Die Sequenz des N-Terminus wurde mit dem manuellen Edman-Abbau bestimmt (94). Die Phenylthiohydantoin-Aminosäuren wurden durch Dünnschichtchromatographie (DC-Alufolien beschichtet mit Kieselgel 60F 254; 20x20 cm; Schichtdicke: 0.25 mm; Merck, Darmstadt) identifiziert.

2.4.6. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Lowry et al. (95) bestimmt. Folgende Lösungen wurden verwendet:

A = 2%ige Kupfersulfatlösung
B = 4%ige di-Kaliumtartratlösung
C = 3%ige Natriumcarbonatlösung
D = Gemisch der Lösungen A, B und C im Verhältnis 1:1:50.

(Diese Lösung wurde zu Beginn der Proteinbestimmung immer frisch angesetzt.)

E = 1:1-Verdünnung des Folin-Ciocalteus-Phenolreagenzes mit H_2O.

Rinderserumalbumin wurde bei der Anfertigung der Eichkurve (0-250 µg Protein) als Standardprotein benutzt.

Zu den Proteinproben, die in einem Volumen von 0.5 ml an 1 N Natronlauge gelöst waren, wurden unter Schütteln 5 ml der Lösung C gegeben. Die Ansätze wurden 10 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 0.5 ml der Lösung E zugesetzt. Nach gründlichem Mischen wurden die Ansätze für weitere 30 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Schließlich wurde die Extinktion der Proben bei 578 nm im Zeiss-Spektralphotometer M4 QIII in einer Glasküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Sollte der Proteingehalt von Membranfraktionen bestimmt werden, so wurde das zu untersuchende Material und auch das Rinderserumalbumin in einer 2%igen SDS-Lösung suspendiert und 5 Min. gekocht. Danach wurden die Proben in einer Eppendorf Tischzentrifuge 3200 zentrifugiert. Von den Überständen wurde der Proteingehalt wie bereits beschrieben bestimmt.

2.4.7. LPS-Bestimmung: Messung des 2-Keto-3-desoxyoctanoat-Gehalts

Die lyophilisierten Proben mit unbekanntem LPS-Gehalt wurden in 0.5 N Schwefelsäure bei 100°C 8 Min. hydrolisiert. KDO wird dabei aus dem LPS freigesetzt. Die Menge an KDO in den Hydrolysaten wurde mit Hilfe der in (96) beschriebenen Thiobarbitursäure-Methode bestimmt. Als Standard wurde reines KDO verwendet.

2.4.8. Auftrennung der Phospholipide

Die Phospholipide wurden durch Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel-beschichteten Folien (DC-Alufolien, 60F 254, 20x20 cm, Schichtdicke 0.25 mm; Merck, Darmstadt) mit einem Laufmittel folgender Zusammensetzung aufgetrennt:

Chloroform	13 Volumenteile
Methanol	5 Volumenteile
Essigsäure	2 Volumenteile.

2.4.9. Radioaktivitätsmessung:

2.4.9.1. in wässrigen Proben

10 bis 30 µl-Aliquots wurden mit 10 ml Unisolve 1-Szintillator im Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer 2450 gezählt.

2.4.9.2. in Chloroform/Methanol-Extrakten

Auf MN218-Rundfilter (Ø 2.3 cm, Macherey-Nagel & Co., Düren) wurden 10-100 µl der jeweiligen Proben pipettiert. Nach 15 minütigem Trocknen unter einer IR-Lampe wurden die Filter in Szintillationsgläschen überführt und mit 10 ml Omnifluor-Szintillator (4 g Omnifluor/l Toluol) im oben angegebenen Szintillationszähler gezählt.

2.4.9.3. in SDS-Polyacrylamidgelen

Die fixierten und gefärbten Elektrophoreseprofile wurden mit einer Rasierklinge in 2 mm breite Stücke zerschnitten. Die Gelstücke wurden in Szintillationsgläschen gelegt. Nach Zugabe von 0.5 ml Protosol zu jedem Gelstück folgte eine 2 1/2 stündige Inkubation bei 60°C. Am Ende der Inkubation wurden jedem Gläschen 5 ml Omnifluor Szintillator (siehe 2.4.9.2.) zugesetzt und die Radioaktivität gemessen.

2.4.9.4. von markierten Flecken auf Dünnschicht-Chromatogrammen

Die durch Fluoreszenz oder Jodfärbung identifizierten Flächen von radioaktiv markierten Proben wurden ausgekratzt. Die von einem Flecken stammenden Partikel der Trägermasse wurden mit 10 ml Omnifluor-Szintillator im bereits genannten Szintillationszähler gezählt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des λ-Rezeptorproteins

3.1.1. Identifizierung des λ-Rezeptorproteins (lam B-Genprodukts)

Glasperlenhüllen von Wildtyp-Zellen (HfrG6), die in einem Minimalmedium mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen waren, zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung neben den ausgeprägten Banden der Hauptproteine der äußeren Membran eine zusätzliche Bande mit intensiver Coomassie-Färbung. Betrachtet man im Vergleich dazu das Bandenmuster von Glasperlenhüllen des auf Glucose gewachsenen Wildtyps, so findet man im Bereich der durch Maltose induzierten Hauptbande nur eine schwach gefärbte Bande (Abb. 2).

Es ist bekannt, daß das lam B-Gen, ein Bestandteil des mal B-Operons (68), das Strukturgen für das λ-Rezeptorprotein ist (28,97). Die Synthese des λ-Rezeptors wird durch Maltose induziert (27,68). Das betreffende Protein fehlt natürlich vollständig in Deletionsmutanten des lam B-Gens (28). Weiterhin berichteten Pugsley & Schnaitman (78), daß das λ-Rezeptorprotein und die Proteine Ia/Ib die Eigenschaft teilen, daß sie sehr fest, aber nicht kovalent an die Mureinschicht gebunden sind. Nach der Methode von Rosenbusch (58) hergestellte Murein-Protein-Komplexe von Maltose induzierten Zellen des Wildtyps und einer Deletionsmutante im lam B-Gen (pop 1730) unterscheiden sich

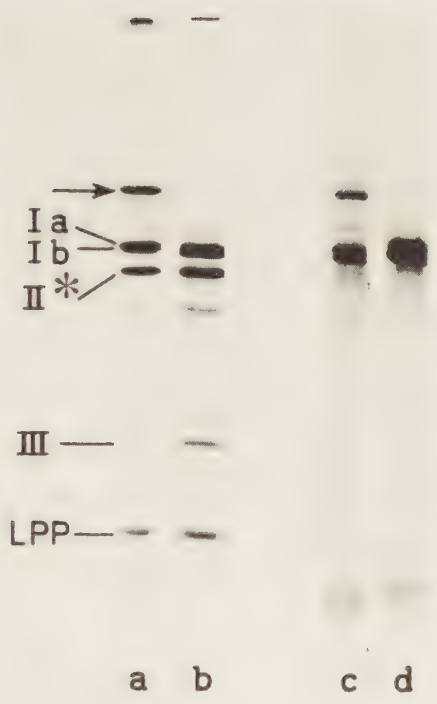

Abb. 2: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen.

(a,b) Glasperlenhüllen von HfrG6-Zellen, die auf Minimalmedium mit Maltose (a) bzw. Glucose (b) als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen waren.

(c,d) Nach der Methode von Rosenbusch (58) hergestellte Protein-Murein-Komplexe von

(c) HfrG6-Zellen, die auf Minimal-Maltose-Medium gezogen worden waren.

(d) pop 1730-Zellen, denen Antibiotic No. 3 als Medium diente.

LPP Lipoprotein.

erwartungsgemäß in ihrem eletrophoretischen Profil durch das Vorhandensein, bzw. die Abwesenheit der Maltose-induzierten Hauptbande (Abb. 2).

Die Tatsache, daß der Wildtyp-Komplex den Phagen λ inaktiviert (0.2 µg Protein pro Ansatz, wovon etwa 2/3 Protein I darstellen, reichen aus um ungefähr 90% des eingesetzten Phagen zu inaktivieren), während die identische Präparation aus den Mutanten-Zellen gegenüber dem Phagen inaktiv bleibt, ist ein weiterer Beweis dafür, daß es sich bei der zusätzlichen Hauptbande um das λ-Rezeptorprotein handelt. Eine Molekulargewichtsbestimmung der Maltose-induzierten Bande mit Hilfe einer SDS-PAGE unter Verwendung von Standardproteinen ergab ein ungefähres Molekulargewicht von 47 000 (Abb. 3). Auch dieses Ergebnis demonstrierte, daß die Bande das lam B-Genprodukt ist, da der gefundene Wert mit den in (27, 98) angegebenen Molekulargewichten für das λ-Rezeptorprotein übereinstimmt.

3.1.2. Isolierung des Rezeptorproteins

Um den λ-Rezeptor proteinchemisch untersuchen zu können, wurde er aus Maltose-gewachsenen HfrG6-Zellen bis zur Homogenität gereinigt. Zunächst wurden "Alcoa"-Hüllen hergestellt. Da von den Proteinen Ia und Ib bekannt ist, daß sie als Protein-Murein-Komplex gegenüber

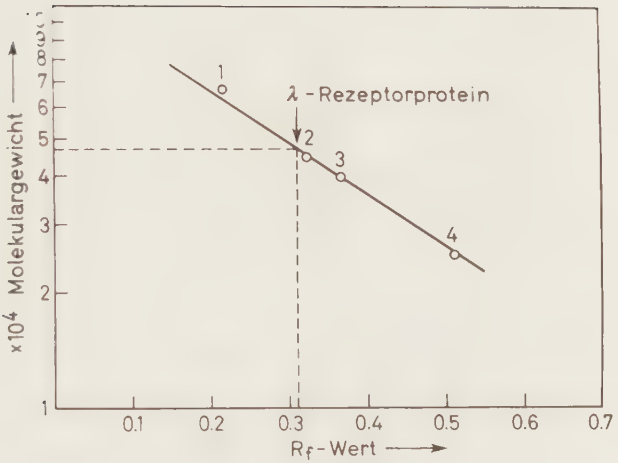

Abb. 3: Molekulargewichtsbestimmung des λ-Rezeptorproteins.

Der λ-Rezeptor und Standardproteine wurden gelelektrophoretisch getrennt. Die R_f-Werte der Standardproteine wurden logarithmisch und ihre Molekulargewichte linear aufgetragen (siehe Abschnitt 2.4.3.3.).

Folgende Standardproteine wurden benutzt:

	Molekulargewicht	R_f-Wert
1 Albumin aus Rinderserum	67 000	0.215
2 Albumin aus Hühnerei	45 000	0.32
3 Aldolase-Monomer	39 500	0.365
4 Chymotrypsinogen A	25 000	0.51

Proteasen resistent sind (39,58), wurde auf Grund der Gemeinsamkeiten zwischen dem λ-Rezeptorprotein und den Proteinen Ia/Ib versucht, den Rezeptor in der Membranfraktion durch proteolytische Verdauung der "Alcoa"-Hüllen anzureichern. Zu diesem Zweck wurden die Hüllen mit Trypsin bzw. mit Pronase behandelt. Nach dem proteolytischen Abbau wurden die Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt. Es zeigte sich, daß das am Murein haftende λ-Rezeptorprotein ebenfalls nicht von Proteasen angegriffen werden kann. Für die Isolierung des Proteins erwies sich die Pronase-Behandlung als die günstigste, da wesentlich mehr von den anderen Hüllenproteinen als unter Trypsin-Einwirkung abgebaut worden waren. Das nach der Pronase-Verdauung unlösliche Material wurde dann mit einer SDS-EDTA-Tris-Pufferlösung extrahiert. Aus dem Überstand nach der Extraktion wurde durch Gelfiltration an einer Bio-Gel P-200-Säule das λ-Rezeptorprotein elektrophoretisch rein erhalten (Einzelheiten, siehe Methoden). Nach jedem Reinigungsschritt wurde das Material elektrophoretisch analysiert (Abb. 4) und eine Inaktivierungskinetik gegenüber dem Phagen angefertigt (Tab. 2).

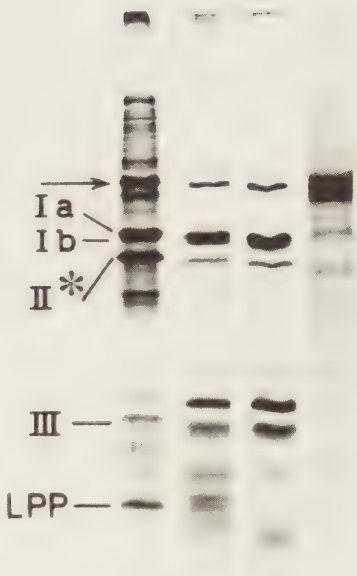

Abb. 4: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen Reinigung des λ-Rezeptorproteins (Pfeil; siehe 2.3.3. und 3.1.2.):

(a) "Alcoa"-Hüllen von Maltose-gewachsenen HfrG6-Zellen;

(b) dieselbe Präparation nach Pronase-Behandlung;

(c) der Überstand nach SDS-EDTA -Extraktion des Pronase verdauten Materials;

(d) das λ-Rezeptorprotein nach Chromatographie an einer Bio-Gel P-200-Säule;

LPP Lipoprotein.

Tabelle 2: Reinigung des λ-Rezeptorproteins[a)]

Reinigungsschritt	Menge der Fraktion (g lyophilisiertes Material)	spezifische Aktivität[b)]
"Alcoa"-Hüllen	15	6.7
"Alcoa"-Hüllen nach Pronase-Verdauung	10	5.9[c)]
Überstand nach SDS-EDTA-Extraktion	6	16.3
Bio-Gel P-200 Säulen-Chromatographie (elektrophoretisch reines λ-Rezeptor-protein)	0.008	inaktiv[d)]

[a)] 200 g gefrorene HfrG6-Zellen waren das Ausgangsmaterial einer Aufarbeitung.

[b)] Die spezifische Aktivität ist in K/mg Protein angegeben. Die Inaktivierung der Phagen folgt der Gleichung

$\frac{P}{P_o} = e^{-kt}$, wobei P_o die Anzahl der Phagen zu Beginn des Versuchs ist, während P die Zahl der Phagen zum Zeitpunkt t ist. Durch mathematische Umformung ergibt sich daraus die Gleichung

$\ln \frac{P_o}{P} = k \cdot t$; für $t_{1/2}$, die Zeit nach der die Hälfte der eingesetzten Phagen vom Extrakt inaktiviert worden ist, hat die Gleichung folgendes Aussehen

$\ln \frac{2}{1} = k \cdot t_{1/2}$ oder nach k aufgelöst $k = \frac{0.693}{t_{1/2}}$.

Nimmt man eine Inaktivierungskinetik auf und trägt den Logarithmus von

$\frac{P}{P_o}$ x 100 gegen die Zeit auf, so kann man aus der graphischen Darstellung $t_{1/2}$ ermitteln und somit k ausrechnen.

c) Für die Abnahme der spezifischen Aktivität gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

1) Es findet eine minimale elektrophoretisch (Abb. 4) nicht nachweisbare Verdauung des Rezeptorproteins statt.

2) Durch den Abbau benachbarter Moleküle wird die Konformation des Rezeptormoleküls auf dem Murein und somit die Rezeptoraktivität verändert.

d) Wie auch schon in (28) beschrieben, verliert der Rezeptor durch Kochen in SDS seine Aktivität. Im Verlauf der hier vorgestellten Isolierung wurde die Rezeptorpräparation vor der Säulenchromatographie in SDS-haltigem Puffer gekocht.

3.1.3. Proteinchemische Untersuchungen des Rezeptormoleküls

3.1.3.1. Aminosäurezusammensetzung

Von zwei verschiedenen Rezeptorpräparationen wurden Aminosäureanalysen von unbehandeltem sowie von Perameisensäure-oxidiertem Protein durchgeführt. Die Hydrolysedauer betrug bei der einen Präparation 24 und 48 Stunden, während mit dem Material der anderen Aufarbeitung noch zusätzlich eine 72 stündige Hydrolyse durchgeführt wurde. Perameisensäure-oxidiertes Protein jeder Präparation wurde jeweils 24 Std. hydrolysiert. In der Tab. 3 ist die Aminosäurezusammensetzung des λ-Rezeptorproteins aufgeführt. Zwischen den verschiedenen Präparationen und den verschiedenen Analysen

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung des lam B-Proteins

Aminosäuren	Schwankungsbreite der Analysendaten	Mittelwerte der Analysendaten	Anzahl der Analysen, aus denen die Daten berechnet wurden
	Reste (Mole pro 47 000 d -Polypeptid)		
Lysin	22-27	25	9
Histidin	5-8	6-7	9
Arginin	14-18	15	9
Asparaginsäure	68-77	70	9
Threonin	23-26	24	9
Serin	19-29	23	9
Glutaminsäure	48-54	43(50)[a]	9
Prolin	9-12	11	9
Glycin	52-74	65	9
Alanin	49-53	36(50)[a]	9
Cystein	< 0.1[b]	< 0.1	2
Valin	35-38	36	9
Methionin	4-7	5-6	5
Isoleucin	22-25	24	9
Leucin	25-32	29	9
Tyrosin	11-14	13	9
Phenylalanin	21-26	23	9
Tryptophan	14-18[c]	16	2
Diaminopimelinsäure	6-7	6-7	2
Glucosamin	5-7	6-7	2

[a] da im Murein Glucosamin, Alanin, Glutaminsäure und Diaminopimelinsäure im Verhältnis 1:2:1:1 vorkommen, wurden die Alanin- und Glutaminsäuredaten entsprechend korrigiert; die tatsächlich gefundenen Werte stehen in Klammern;

[b] bestimmt als Cysteinsäure;

[c] Analysendaten von Aminosäuregemischen, die von Hydrolysen mit Methansulfonsäure in Gegenwart von 3-(2-Aminoäthyl)-Indol (92) stammten.

ergaben sich Unterschiede von 20 bis 25%, für Serin und Glycin und von 10 bis 15% für die meisten anderen Aminosäuren. Die Threonin- und Serinwerte, beides Aminosäuren, die unter den verwendeten Hydrolysebedingungen teilweise zerstört werden, konnten nicht durch Extrapolation korrigiert werden, da die Verluste die angegebenen Abweichungen nicht überschritten.
Um den Tryptophangehalt des Proteins zu bestimmen, wurden Aminosäuregemische, die von 24- und 48 stündigen Hydrolysen mit Methansulfonsäure in Gegenwart von 3-(2-Aminoäthyl)-Indol (92) stammten, analysiert. Da die gefundenen Diaminopimelinsäure- und Glucosaminreste eine Verunreinigung beider Rezeptorpräparationen mit Murein anzeigen, sind für die Glutaminsäure und das Alanin, beides Aminosäuren, die auch im Murein vorkommen, korrigierte Werte angegeben. Auf der Basis des Methionin- oder des Histidin-Gehaltes des Proteins berechnet sich sein minimales chemisches Molekulargewicht zu etwa 8000. Dieses steht nicht im Widerspruch zum ungefähr sechsmal höheren elektrophoretisch

ermittelten Molekulargewicht von 47 000.

3.1.3.2. Alkylierung mit Jod [1-^{14}C]-Acetamid

Bei den mit Perameisensäure-oxidiertem Rezeptorprotein durchgeführten Analysen, zeigte sich in der Position der Cysteinsäure kein Gipfel. Jedoch ist in (99) ein Dimeres, welches durch Disulfidbrückenbindung entstanden sein soll, als kleinste Einheit mit Phagenrezeptor-Aktivität beschrieben. Da es natürlich problematisch ist, die Anwesenheit oder das Fehlen eines Cysteinrestes in einem Protein dieser Größe nur auf Grund von Aminosäureanalysedaten nachzuweisen, wurde das Protein mit Jod [1-^{14}C]-Acetamid alkyliert. Bei der parallel durchgeführten Alkylierung von Protein I von B/r und dem λ-Rezeptor ließ sich nur im Protein I Radioaktivität nachweisen. Dieses Ergebnis stimmt mit den in (58,100) für das Protein I angegebenen Analysedaten überein, während das in dieser Arbeit isolierte lam B-Protein offenbar kein Cystein enthält. Das Fehlen von Cystein im λ-Rezeptorprotein wurde mittlerweile von Sandermann et al. (98) bestätigt.

3.1.3.3. Tryptischer "Fingerprint"

Wie in der Tab. 3 zu sehen ist, enthält das λ-Rezeptor-

protein etwa 40 Arginin- plus Lysinreste. Dies läßt nach vollständigem tryptischen Abbau etwa 41 Peptide erwarten, wenn es sich bei dem isolierten Protein um eine einheitliche Polypeptidkette handelt. Es wurde eine tryptische Verdauung des Proteins durchgeführt und die Peptide mit Hilfe der "Fingerprint"-Technik aufgetrennt. Nach Ninhydrin-Färbung wurde ein Muster von ungefähr 35 Peptidflecken sichtbar (Abb. 5).

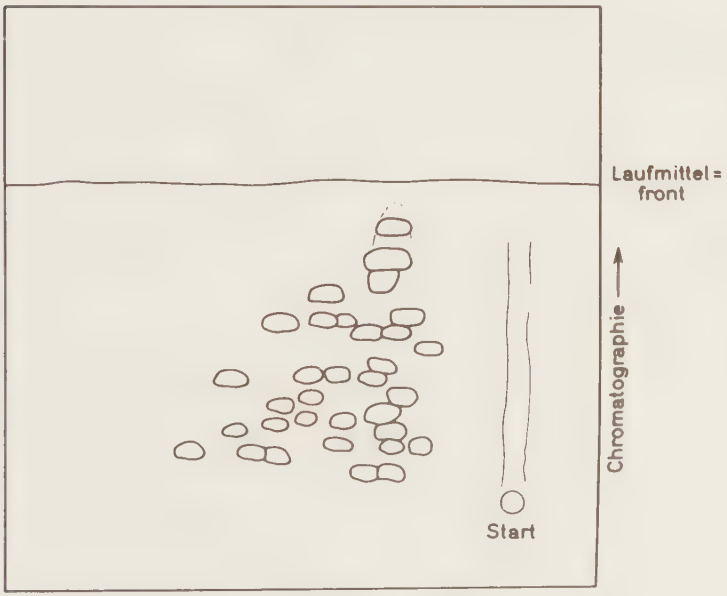

Abb. 5: "Fingerprint" der tryptischen Peptide des isolierten λ-Rezeptorproteins.

Die Anfertigung des tryptischen "Fingerprints" ist in Abschnitt 2.4.4. beschrieben.

Die intensive Färbung des Startflecks zeigte, daß Peptide am Start sitzengeblieben waren oder daß vielleicht ein Trypsin-resistenter "Core" existiert. Die Zahl der gefundenen Peptide steht daher in guter Übereinstimmung mit dem elektrophoretisch ermittelten Molekulargewicht und der daraus berechneten Aminosäurezusammensetzung.

3.1.3.4. N-terminale Sequenz

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz mit dem manuellen Edman-Abbau erbrachte folgende Reihenfolge der ersten sieben Aminosäuren:

Val-Asp-Phe-x-Gly-Tyr-Ala-
(Bei "x" ließ sich nach dem Abbauschritt keine Phenylthiohydantoin-Aminosäure identifizieren.)

Die in den vorangehenden Abschnitten dargestellten proteinchemischen Daten des λ-Rezeptorproteins passen alle sehr gut zusammen: Die Anzahl der nach tryptischer Verdauung gefundenen Peptide bestätigt weitgehend die auf der Grundlage der elektrophoretischen Molekulargewichtsbestimmung, die in etwa das Sechsfache des minimalen chemischen Molekulargewichts ergeben hatte, berechnete Aminosäurezusammensetzung. Diese Ergebnisse und die Existenz einer einzigen N-terminalen Sequenz führen zu dem Schluß, daß das lam B-Protein als eine

Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 47 000 vorliegt.

3.2. Untersuchung der Struktur der äußeren Membran mit Hilfe von Quervernetzung

Die Verwendung von Quervernetzungsreagenzien bei der Aufklärung komplexer Strukturen, wie Enzymkomplexen (101,102), Ribosomen (103,104) und Membranen (74-77, 105) hat sich als sehr brauchbar erwiesen. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um symmetrische bifunktionelle Moleküle, die eine chemische Spezifität für eine bestimmte funktionelle Gruppe der zu untersuchenden Struktur besitzen. Für Untersuchungen von Systemen hoher Komplexität ist es wichtig, daß zur Gewährleistung einer umfassenden Analyse des Quervernetzungsgemisches, Verknüpfungen auch quantitativ wieder gespalten werden können. Die bei der Vernetzungsreaktion mit den früher gebräuchlichen Reagenzien (vorwiegend Diimidoester) gebildeten kovalenten Bindungen sind so stabil, daß unter den Bedingungen, bei denen es zu einer Spaltung kommt, auch die zu analysierende Struktur teilweise zerstört wird. Daher wurden in den letzten Jahren Quervernetzer entwickelt, die leicht spaltbare Bindungen besitzen. Das in dieser Arbeit benutzte, spaltbare Quervernetzungsreagenz, Dithiobis Succinimidyl Propionat (106) acyliert freie primäre und sekundäre aliphatische Aminofunktionen. Eine Disulfid-

Gruppe in der Mitte des Moleküls erlaubt eine einfache Spaltung durch Reduktion. Die Struktur eines Dithiobis-Vernetzungskomplexes und seine Spaltung mit 2-Mercaptoäthanol sind in Abb. 6 dargestellt.

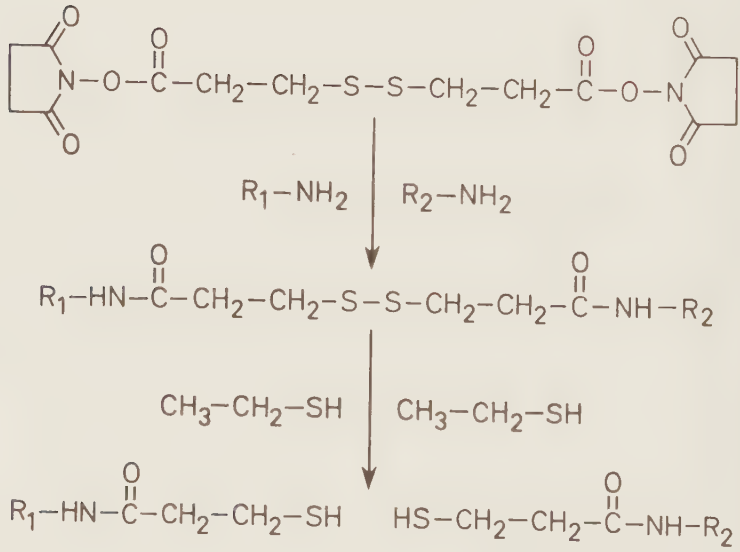

Abb. 6: Struktur eines Dithiobis (Succinimidyl Propionat)-Vernetzungskomplexes und seine Spaltung mit 2-Mercaptoäthanol.

R_1, R_2: Bestandteile des zu untersuchenden Mehrkomponenten-Systems, deren Aminogruppen für das Reagenz zugänglich sind.

3.2.1. Protein-Protein- und Protein-Murein-Wechselwirkungen

Das noch weitgehend ungeklärte Problem der Nachbarschafts-Beziehungen der Hauptproteine in der äußeren Membran wurde mit Hilfe von Quervernetzungsstudien unter Verwendung von Dithiobis Succinimidyl Propionat angegangen. Um Abhängigkeiten zwischen den Proteinen aufzeigen zu können, wurden parallel Hüllen aus Wildtyp-Stämmen und aus Mutanten, denen ein spezielles Hauptprotein fehlte, quervernetzt. Zunächst wurden Glasperlenhüllen des Wildtyp-Stammes JE5506 und seiner Mutante JE5505, die kein Lipoprotein (lpo) besitzt mit dem Reagenz in einem Gewichtsverhältnis von 5:1 von Quervernetzer zu Protein behandelt. Durch zweifache Extraktion mit heißer SDS-EDTA-Trispuffer-Lösung wurde das quervernetzte Material in eine lösliche und eine Murein-gebundene Fraktion aufgetrennt. Danach wurde mit den beiden Fraktionen der zwei Stämme eine SDS-PAGE mit und ohne 2-Mercaptoäthanol durchgeführt. Das Gel mit den nicht reduzierten Proben, zeigte nach Färbung nur bei den löslichen Fraktionen fünf Banden (Abb. 7a,b): Je eine schwache Bande in der Höhe der Proteine I, II* und III, sowie zwei Banden im 70-80 000 Dalton-Bereich. Die ans Murein vernetzten Proteine (Murein-gebundene Fraktion) waren in Abwesenheit eines Reduktionsmittels natürlich nicht ins Gel gewandert.

Die elektrophoretische Auftrennung der reduzierten

Abb. 7: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen.
Mit Dithiobis Succinimidyl Propionat quervernetzte Glasperlenhüllen des Wildtypstammes JE5506 (a,c,e) und seiner Lipoprotein (LPP)-Mutante JE 5505 (b,d,f) (siehe 2.3.6. und 3.2.1.).
Lösliche (a-d) und Murein-gebundene (e,f) Fraktionen nach Extraktion des quervernetzten Materials mit heißer SDS-Pufferlösung (siehe 2.3.7. und 3.2.1.). Gelelektrophoretische Auftrennungen der Fraktionen ohne (a,b) und in Gegenwart (c-f) von 2-Mercaptoäthanol.

Proben ergab charakteristische Bandenmuster (7, c-f): In den löslichen Fraktionen der beiden Stämme konnte man die Hauptmenge der Proteine I und III sowie eine intensiv gefärbte Bande in der höhermolekularen Region

des Gels erkennen. Daneben befand sich eine geringe Menge des Proteins II* und des Lipoproteins (nur bei der Probe des Wildtyp-Stammes; mit Lipoprotein ist in diesem Zusammenhang nur die nicht kovalent gebundene Fraktion dieses Proteins gemeint) in der löslichen Fraktion. Ans Murein waren, wie die Elektrophoreseprofile der beiden Stämme zeigten der größte Teil des Proteins II* und des Lipoproteins (nur beim Wildtyp) vernetzt. Weiterhin war noch in der Murein-gebundenen Fraktion dieses Stammes etwas Protein I vorhanden. Die Anheftung des Proteins I ans Murein hängt scheinbar von der Gegenwart des Lipoproteins ab. Die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Analyse der reduzierten Proben sind in der Tab. 4 zusammengefaßt.

Um abzusichern, daß es sich bei den gefundenen Banden tatsächlich um die Proteine I und II* handelt, sowie um festzustellen, ob sich die Verteilung der Proteine auf die beiden Fraktionen verändert, wurden Mutanten, denen jeweils eines der besagten Proteine fehlt, in derselben Weise quervernetzt. Da die verwendeten Stämme P530 (I^-) und P400 1.3 (II^{*-}) Abkömmlinge des Wildtypstammes P400 sind, wurden auch P400-Glasperlenhüllen mit Dithiobis Succinimidyl Propionat behandelt, um eventuelle Stammspezifitäten bezüglich der Verteilung der Hauptproteine auf die beiden Fraktionen ausschließen zu können. Die Elektrophoresen von den Fraktionen aus

Tabelle 4: Durch gelelektrophoretische Auftrennung erhaltene Verteilung der Hauptproteine auf die Membranfraktionen, die durch SDS-Extraktion quervernetzter Glasperlenhüllen der Stämme JE5505 und JE5506 gewonnen worden waren.

	Wildtyp (JE5506)		lpo-Mutante (JE5505)	
Proteine	lösliche Frkt.	Murein-geb. Frkt.	lösliche Frkt.	Murein-geb. Frkt.
Ia/Ib	∿ 95%	∿ 5%	∿ 100%	--
II*	∿ 5%	∿ 95%	∿ 10%	∿90%
III	∿100%	--	∿ 100%	--
Lipoprotein	∿ 5%	∿ 95%	--	--

Die Prozentzahlen wurden durch Abschätzen der Breite und der Intensität der Coomassie-Banden ermittelt. Auf eine densitometrische Auswertung wurde verzichtet, da es sich bei allen Hauptproteinen um eine ganz eindeutige Verteilung handelte.

den drei Stämmen mit und ohne Reduktionsmittel bestätigen die für die Stämme JE5505 und JE5506 beschriebenen Ergebnisse. Bei der I- und der II*-Mutante fehlte auf den Gelen der reduzierten Proben sowohl in der löslichen als auch in der Murein-gebundenen Fraktion die jeweilige Hauptproteinbande. Bemerkenswert war, daß bei den Mutanten das jeweils vorhandene Protein in größerer Menge als beim Wildtyp in der Murein-gebundenen Fraktion vorkam (Abb. 8).

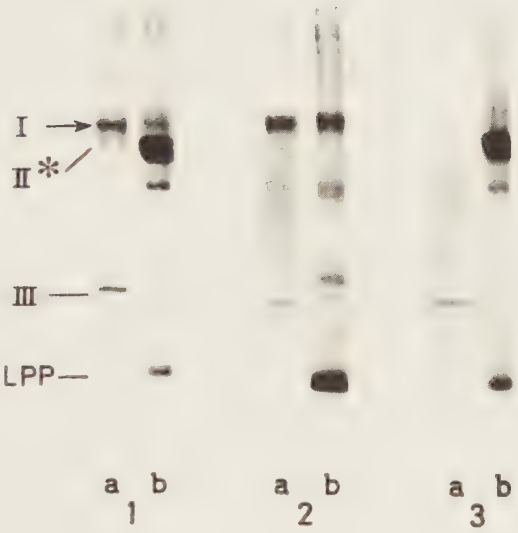

Abb. 8: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen.

Mit Dithiobis Succinimidyl Propionat quervernetzte Glasperlenhüllen des Wildtypstammes P400 (1) sowie seiner IF⁻ (2) und seiner Ia/Ib-Mutante (3), P400 1.3 bzw. P530.

Lösliche (a) und Murein-gebundene (b) Fraktionen nach Extraktion des quervernetzten Materials mit heißer SDS-Pufferlösung (siehe 2.3.7. und 3.2.1.).

Gelelektrophoretische Auftrennung der Fraktionen in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol.

LPP Lipoprotein.

3.2.2. Nachweis der direkten Verknüpfung des Proteins II* ans Murein

Die Ergebnisse der im vorangehenden Abschnitt durchgeführten Quervernetzungsexperimente ergänzen die von Reithmeier & Bragg veröffentlichten Resultate (76). Die Autoren konnten auf Grund ihrer Quervernetzungsstudien keine Aussage darüber machen, ob das Protein II* und die freie Form des Lipoproteins direkt ans Murein bzw. an die Murein-gebundene Form des Lipoproteins, verknüpft werden können oder ob eines der Proteine indirekt über das andere ans Murein gebunden wird. Die Quervernetzungsversuche mit den Glasperlenhüllen der Lipoprotein-Mutante und des Stammes P400 1.3 (II*$^-$) zeigten, daß sowohl vom Protein II* als auch vom Lipoprotein die Hauptmenge bei Abwesenheit des anderen Proteins in der Murein-gebundenen Fraktion verbleibt. Das bedeutet, daß es sich bei beiden Proteinen offenbar nicht um eine indirekte Beziehung zum Murein handelt. Allerdings sagen die Versuche nichts über die Art der Verknüpfung der Proteine ans Murein aus. Für das Lipoprotein konnte nicht entschieden werden ob es direkt oder über seine gebundene Form mit dem Murein wechselwirkt. Im Gegensatz dazu konnte die Beziehung Protein II*-Murein näher untersucht werden. Drei Möglichkeiten des Verbleibs von Protein II* in der Murein-gebundenen Fraktion sind denkbar:

- das Protein wird direkt über den Quervernetzer ans Murein gebunden;
- Protein II* wird in großer Zahl mit anderen II*-Molekülen vernetzt, so daß die gebildeten Aggregate nicht mehr durch SDS-Extraktion vom Murein getrennt werden können;
- durch die Quervernetzung wurden sowohl Protein II*-Murein- als auch II*-II*-Verknüpfungen hergestellt.

Verdaut man quervernetzte Hüllen der lpo-Mutante mit Lysozym und führt anschließend eine SDS-PAGE in Abwesenheit von Reduktionsmittel durch, so erhält man, je nachdem welche Möglichkeit realisiert ist, verschiedene Elektrophoreseprofile und eine unterschiedliche Verteilung der unter Lysozymeinwirkung gebildeten Muropeptide. Entspräche die erste Möglichkeit der Realität, so wäre auf Coomassie-gefärbten Gelen nur die Protein II*-Bande zu sehen. Die Muropeptide wären ebenfalls in der II*-Bande lokalisiert, da sie in diesem Fall über den Quervernetzer kovalent an die Proteinmoleküle gebunden wären. Im zweiten Fall würde nach der enzymatischen Spaltung des Mureins kein Protein ins Gel eindringen, während die niedermolekularen Muropeptide durch das Gel hindurchwandern würden. Wäre die dritte Möglichkeit verwirklicht, würde nach der Enzymbehandlung eine Mischung von Mono-, Oligo- oder Polymeren des Proteins II* entstehen. Sofern diese Komplexe nicht zu groß würden, um in die Gelmatrix einzu-

dringen, wären auf dem Gel die den Aggregaten entsprechenden Banden zu erkennen. In diesen Banden müßten auch die an jeweils eines der II*-Moleküle verknüpften Muropeptide zu finden sein.

Die Realisierung der letzten Möglichkeit wurde durch das folgende Experiment bestätigt. Um die Verteilung der Muropeptide im Gel ermitteln zu können, wurde das Murein mit [^{3}H]-Diaminopimelinsäure spezifisch radioaktiv markiert. Zu diesem Zweck wurde die lpo-Mutante mit Hilfe einer Diäthylsulfat-Mutagenese und einer Penicillin-Selektion für Lysin-Bedürfnis Lysin-auxotroph gemacht. Da das Murein mit [^{3}H]-Diaminopimelinsäure spezifisch markiert werden sollte, war es notwendig eine Mutante mit defekter Diaminopimelinsäure-Decarboxylase zu verwenden, um sicher zu sein, daß nichts von der angebotenen Diaminopimelinsäure zu Lysin decarboxyliert wird. Die Lysin-auxotrophen Zellen wurden daher nach der in (107) beschriebenen Methode auf "leakiness" bei Wachstum in Gegenwart von [^{3}H]-Diaminopimelinsäure getestet. Ein Stamm mit entsprechender Auxotrophie wurde dann in Gegenwart von [^{3}H]-Diaminopimelinsäure aufgezogen. Glasperlenhüllen dieser Zellen wurden quervernetzt und zweimal mit heißer SDS-Pufferlösung extrahiert. Die Murein-gebundene Fraktion wurde mit Lysozym behandelt. Das Lysozym verdaute Material wurde sowohl ohne als auch in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol gelelektrophoretisch analysiert.

Abb. 9 zeigt die Bandenmuster der Gele sowie die Radioaktivitätsverteilung in den Gelen. Die drei Radioaktivitätsgipfel, der nicht reduzierten Probe, stimmen mit den Gelregionen intensiver Coomassie-Färbung überein. Bei diesen Bereichen handelt es sich offenbar um das Monomer, das Dimer und am Start des Gels um höher organisierte Komplexe des Proteins II*, die nicht in die Gelmatrix hineinwandern können. Dies wird durch das Muster des Gels der reduzierten Probe bestätigt, auf dem das Protein II* neben der Lysozymbande als einzige Komponente zu erkennen ist. Das Erscheinen mehrerer distinkter Banden in der II*-Region des Gels, der nicht reduzierten Probe, deutet auf Murein-Fragmente verschiedener Größe hin, die nach der Lysozym-Verdauung über den Quervernetzer kovalent am Protein II* gebunden bleiben.

3.2.3. Bestimmung des Lipopolysaccharid- und Phospholipid-gehalts in den Membranfraktionen nach Quervernetzung und SDS-Extraktion

Um abzusichern, daß es sich bei den aufgezeigten Protein-Protein- bzw. Protein-Murein-Wechselwirkungen um echte Nachbarschaftsbeziehungen handelt, mußte nach der Beteiligung von LPS oder/und Phospholipid an den entstandenen Vernetzungskomplexen gefragt werden. Zu diesem Zweck wurde der LPS und der Phospholipid-Gehalt

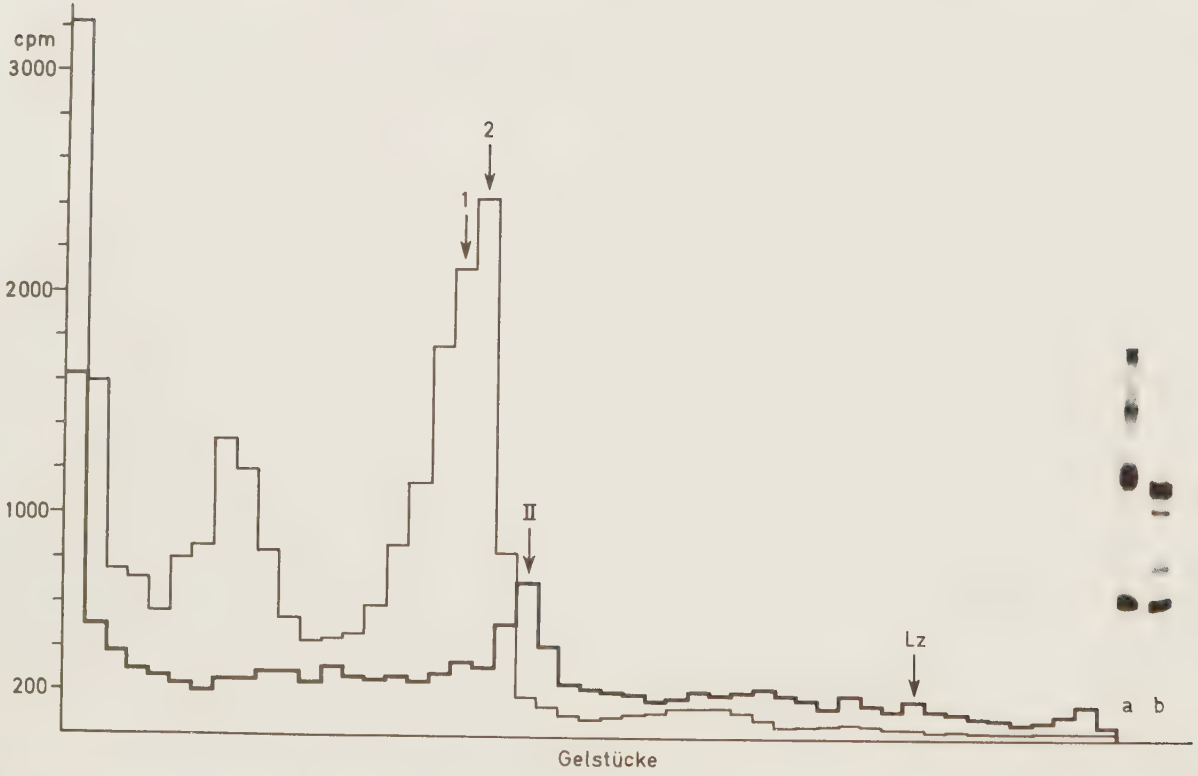
cpm
3000
2000
1000
200
2
1
II
Lz
a b
Gelstücke

Abb. 9: Radioaktivitätsverteilung in SDS-Polyacrylamidgelen.

Die Lysozym verdaute Murein-gebundene Fraktion aus Zellen, die mit [^{3}H]-Diaminopimelinsäure markiert worden waren, wurden gelelektrophoretisch mit (———, Gel b) und ohne (———, Gel a) Reduktionsmittel aufgetrennt.

Die Versuchsdurchführung ist detailliert in den Abschnitten 2.4.9.3. und 3.2.2. beschrieben.

Lz Lysozym.

in den nach SDS-Behandlung von quervernetzten Glasperlenhüllen des Wildtyps (JE5506) und der lpo-Mutante (JE5505) erhaltenen Fraktion bestimmt. Der LPS-Gehalt wurde durch Bestimmung des KDOs (siehe 2.4.7.) in den Membranfraktionen gemessen. Das Gesamtphospholipid wurde auf folgende Weise ermittelt: Aus Membranfraktionen, die von ^{32}P-markierten Zellen (siehe 2.2.) stammten, wurden mit Chloroform/Methanol (2:1) die Phospholipide extrahiert. Die Radioaktivität in den Extrakten wurde durch Szintillationszählung bestimmt (siehe 2.4.9.2.). Da die spezifische Aktivität des Mediums bekannt war (1.5 Ci/Mol PO_4), konnte die Phosphatkonzentration in jedem Extrakt errechnet werden. Da die Hauptphospholipide der äußeren Membran, das Phosphatidyläthanolamin und das Phosphatidylglycerin jeweils nur eine Phosphatgruppe besitzen, entsprach die errechnete Phosphatkonzentration ungefähr der Phospholipidkonzentration in den Extrakten. Das Cardiolipin mit seinen zwei Phosphatgruppen konnte auf Grund seines geringen Anteils (5-15%) an den Phospholipiden der äußeren Membran ver-

nachlässigt werden. In der Tab. 5 ist die Verteilung der beiden Membrankomponenten aufgeführt. Die Ursache für den Verlust von über 98% des Phospholipids der quervernetzten Glasperlenhüllen beider Stämme nach der SDS-Behandlung konnte auf sein Verhalten während der Acetonfällung der löslichen Fraktionen zurückgeführt werden. Nach Zugabe von Aceton sanken die gebildeten Phospholipidpartikel nicht zu Boden, sondern blieben an der Wand der gläsernen Meßzylinder, in denen die Fällungen durchgeführt wurden, haften. Dies konnte durch entsprechende Radioaktivitätsmessungen bestimmt werden. Der Verlust von 40-50% des LPS nach SDS-Extraktion wurde nicht näher untersucht. Wie beim Phospholipid dürfte er auch hier während der Präzipitation der Proteine mit Aceton aus den löslichen Fraktionen entstanden sein.

Um Aussagen über mögliche Nachbarschaftsbeziehungen machen zu können, muß man die absoluten Mengen an LPS und Phospholipid in den Fraktionen zu der vorhandenen Menge an bestimmten Proteinen in Bezug setzen. Für die Murein-gebundene Fraktion der lpo-Mutante (JE5505) ist es nach der Durchführung einer Proteinbestimmung möglich, auch die absolute Menge des Proteins zu erhalten, da praktisch das gesamte Protein der Fraktion als Protein II* vorliegt. Pro mg Trockengewicht des Materials ergeben sich für die Komponenten folgende Konzentrationen:

Tabelle 5: LPS- und Phospholipidgehalt in den Membranfraktionen des Wildtyp-Stammes JE5506 und seiner lpo-Mutante JE5505 nach Quervernetzung und SDS-Extraktion

Stamm	Fraktion	LPS-Gehalt in %[a)]	Phospholipidgehalt in %[a)]
JE5505 (lpo)	lösliche Fraktion	63.8[b)]	1.7
	Murein-gebundene Fraktion	1.6[b)]	0.5
JE5506	lösliche Fraktion	52.1[b)]	0.9
	Murein-gebundene Fraktion	4.1[b)]	0.3

a) Der LPS- bzw. der Phospholipidgehalt der quervernetzten Glasperlenhüllen jedes Stammes wurde gleich 100% gesetzt; wobei es sich beim Phospholipid jeweils um den mit Chloroform/Methanol (2:1) extrahierbaren Anteil handelt.

b) Mittelwerte von zwei KDO-Bestimmungen.

---

11 n Mole Protein II*

6.1 " Phospholipid

1.1 " LPS

Die absoluten Mengen, auf denen diese Werte basieren, waren:

8 mg lyophilisiertes Material

3 mg Protein

49 n Mole Phospholipid

27 n Mole KDO bzw. 9 n Mole LPS (siehe 2.4.7.).

Auf 11 Moleküle des Proteins II* kommen also 6 Moleküle Phospholipid sowie 1 Molekül LPS. Dieses Verhältnis der drei Komponenten macht bei der vorhandenen "Alles- oder Nichts-Verteilung" des Proteins II*, d.h. fast alle Proteinmoleküle verbleiben nach der Extraktion am Murein, eine Phospholipid- bzw. LPS-Beteiligung an der Protein II*-Murein-Wechselwirkung unwahrscheinlich. Das gesamte Protein kann z.B. keinesfalls über Phospholipid an das Murein gebunden sein. Die gefundenen Konzentrationen sind ein eindeutiger Beweis für die direkte Bindung Protein II*-Murein. In der Murein-gebundenen Fraktion des Wildtyps ist neben dem Protein II* auch die Hauptmenge des Lipoproteins vorhanden (siehe 3.2.1.). Dieses ist entweder direkt oder über seinen kovalent gebundenen Anteil ans Murein vernetzt. Eine Beteiligung von Phospholipid oder/und LPS an diesen Verknüpfungen ist nicht realistisch, da sich der Proteinanteil gegenüber den Nicht-Proteinkomponenten in dieser Fraktion im Gegensatz zur identischen Fraktion der lpo-Mutante durch die Gegenwart des zahlenmäßig häufigsten Proteins der Zelle beträchtlich erhöht hat (9.5 mg lyophilisiertes Material, 4.7 mg Protein). Bei der Vernetzung des Protein I ans Lipoprotein (siehe 3.2.1.) ist wegen des im Vergleich zur Gesamtmenge geringen Anteils von I in der Murein-gebundenen Fraktion

eine Beteiligung von Phospholipid oder/und LPS möglich. Diese Aussagen bezüglich der Lipoprotein-(Lipoprotein-) Murein- sowie der Protein I-Lipoprotein-Murein-Wechselwirkungen stützen sich nicht auf berechnete molare Konzentrationen von Phospholipid, LPS und Protein in der Murein-gebundenen Fraktion des Wildtyp-Stammes, wie sie für die lpo-Mutante bestimmt worden waren. Die Grundlage der Interpretationen ist die ungefähre Übereinstimmung der absoluten Mengen der Komponenten in den Murein-gebundenen Fraktionen der zwei Stämme, mit Ausnahme des Proteinanteils, der im Wildtyp natürlich größer war (siehe oben).

3.3. Untersuchung der Orientierung der Membrankomponenten in der äußeren Membran mit Hilfe von Fluorescamin-Markierung

Smit et al. (38) haben vorgeschlagen, daß das Phospholipid nur an der Innenfläche der äußeren Membran vorkommt. Durch Markierungsexperimente mit Fluorescamin wurde die noch offene Frage der Verteilung des Phospholipids in der Membran angegangen. Daneben boten die Untersuchungen eine Möglichkeit, Aussagen über die Lokalisation der Hauptproteine an der Zelloberfläche und somit über ihre Orientierung in der Membran zu erhalten. Das für diese Zwecke benutzte Reagenz, Fluorescamin, reagiert bei pH-Werten von 8.0 bis 9.0 mit einer

Halbwertszeit von Millisekunden mit primären Aminogruppen zu einer intensiv fluoreszierenden Substanz (Abb. 10). Das überschüssige Reagenz wird mit einer

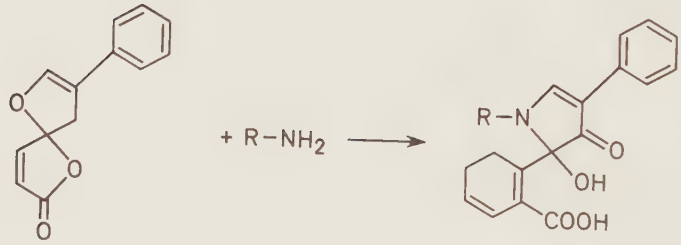

Abb. 10: Reaktionsmechanismus der Fluorescamin-Markierung.

$R\text{-}NH_2$: primäre Aminogruppe einer Membrankomponente.

Halbwertszeit von Sekunden zu nicht fluoreszierenden, wasserlöslichen Verbindungen hydrolysiert (108). Durch die Schnelligkeit der Reaktion und der Hydrolyse sollte mit dem Fluorescamin eine oberflächenspezifische Markierung möglich sein und eine Diffusion des Reagenzes in tiefere Schichten nicht vorkommen. Außerdem ist auf Grund des lipophilen Charakters des Fluorescamins nicht zu erwarten, daß es durch die äußere Membran gelangt, da nach Nikaido (19) solche Substanzen nicht permeieren. N-terminale Aminosäuren von Proteinen, ε-Aminogruppen der Lysinreste und freie Aminogruppen von Phospholipiden wären, sofern sie an der Zelloberfläche liegen, die Reaktionspartner des Fluorescamins.

3.3.1. Markierung von ganzen Zellen und Glasperlenhüllen

Ganze Zellen und Glasperlenhüllen des Stammes P400 wurden in Phosphatpuffer suspendiert und durch Zugabe von Fluorescaminlösung markiert (siehe 2.3.10.1./2.). Von den markierten Zellen wurden anschließend Glasperlenhüllen hergestellt. Nach SDS-Plattengel-Elektrophorese der Zellhüllpräparationen konnte man im UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) auf dem Gel folgende Fluoreszenzbanden erkennen (Abb. 11): Beide Proben zeigten im niedermolekularen Bereich eine stark-fluoreszierende Bande, der nach Anfärben des Gels mit Coomassie Brilliant

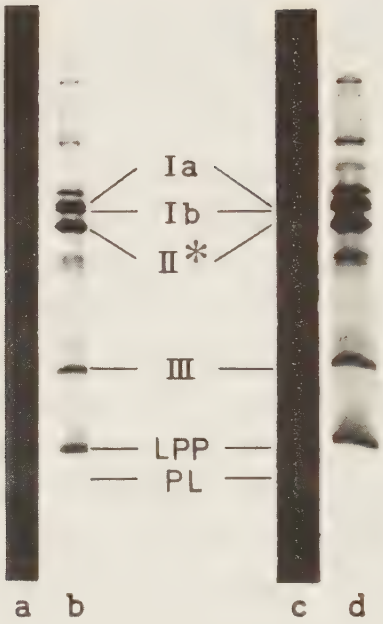

Abb. 11: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen.

Fluoreszenzbanden (a,c) und Bandenmuster nach Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue

(a,b) von Glasperlenhüllen Fluorescamin-markierter P400-Zellen (siehe 2.3.10.1. und 3.3.1.).

(c,d) von Glasperlenhüllen des gleichen Stammes, die nach ihrer Präparation mit Fluorescamin behandelt worden waren (siehe 2.3.10.1. und 3.3.1.).

LPP Lipoprotein.

PL Phospholipid.
(Das Photographieren der fluoreszierenden Gele unter UV-Licht hatte ein Verblassen der Fluoreszenz zur Folge. Die ursprünglichen Banden fluoreszierten ungefähr 5x so intensiv.)

Blue keine Proteinbande zugeordnet werden konnte.

Weiterhin war in beiden Fällen die Protein II*-Bande

Fluoreszenz-markiert. Die Fluoreszenz der beiden markierten Banden war bei den mit Fluorescamin behandelten Glasperlenhüllen intensiver. Zudem konnte man bei dieser Probe eine schwach fluoreszierende Doppelbande oberhalb der II*-Bande erkennen, die auf dem gefärbten Gel als die Proteine Ia und Ib identifiziert werden konnte.

3.3.2. Identifizierung der Hauptfluoreszenzbande als markiertes Phosphatidyläthanolamin

In ganzen Zellen wurden also im wesentlichen nur das Protein II* und eine niedermolekulare Verbindung markiert. Folgende Eigenschaften legten die Vermutung nahe, daß es sich bei dieser stark fluoreszierenden Bande um markiertes Phospholipid handelt: ihre elektrophoretische Beweglichkeit und das Fehlen einer Coomassie-Färbung. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Fluorescamin-markierte Zellen mit Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert, um die Lipidfraktion zu gewinnen (siehe 2.3.13.). Anschließend wurden die Lipide durch Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt (siehe 2.4.8.). Als Referenzen wurden Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylglycerin und Fluorescamin-markierte Phospholipidvesikel (siehe 2.3.11.) aufgetragen. Die markierten bzw. unmarkierten Phospholipide wurden im UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) und durch anschließende Jodfärbung identifiziert. Die Lage der

Flecken auf dem Chromatogramm (Abb. 12) verdeutlicht,

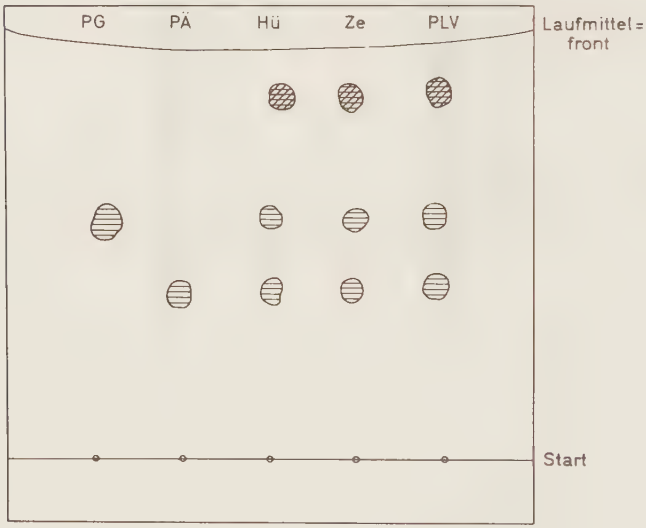

Abb. 12: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der aus Fluorescamin-markierten Zellhüllen (Hü) und Zellen (Ze) extrahierten Phospholipide.

Als Referenzen wurden Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidyläthanolamin (PÄ) und Fluorescamin-markierte Phospholipidvesikel (PLV) aufgetragen. Die Flecken wurden unter UV-Licht (366 nm, ⁄) und durch Jodfärbung (——) identifiziert.

Weitere Erläuterungen sind in den Abschnitten 2.3.10./11./13., 2.4.8. und 3.3.2. zu finden.

daß es sich bei der fluoreszierenden Zellkomponente um markiertes Phosphatidyläthanolamin handelt, da es die einzige Komponente der Phospholipidvesikel ist, die eine primäre Aminogruppe besitzt. ^{32}P-markierte Zellen wurden in derselben Weise behandelt. Nach der Identifizierung wurde die Radioaktivität in den Flecken bestimmt (siehe 2.4.9.4.). Die Auswertung der Zählergebnisse ergab, daß 15% des extrahierbaren Phosphatidyläthanolamins Fluoreszenz-markiert sind.

3.3.3. Versuche zum Nachweis der Oberflächenspezifität der Fluorescamin-Markierung

Die Ergebnisse der Markierungsexperimente deuten darauf hin, daß ein Teil des Proteins II* an der Zelloberfläche liegt. Diese Oberflächenlokalisation war schon aus der Rezeptorfunktion des Proteins für Bakteriophagen abgeleitet worden (siehe Einleitung). Außerdem scheint die Aminogruppe des Phosphatidyläthanolamins ebenfalls nach außen gerichtet zu sein. Dies steht im Gegensatz zu der in (38) vorgeschlagenen streng asymmetrischen Verteilung des Phospholipids auf die innere Hälfte der äußeren Membran. Zur Absicherung der in den Fluorescamin-Versuchen gefundenen Lokalisation mußte zunächst die Oberflächenspezifität, der Markierung nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden ganze Zellen markiert und anschließend die periplasmatischen Proteine isoliert (siehe 2.3.9.). Nach

elektrophoretischer Auftrennung waren im Elektrophoreseprofil der periplasmatischen Fraktion keine Fluoreszenzbanden zu erkennen. Wurden dagegen periplasmatische Proteine, die nach ihrer Isolierung mit Fluorescamin behandelt worden waren, aufgetrennt, so zeigten sich erwartungsgemäß über das ganze Gel verteilt zahlreiche Fluoreszenzbanden. Nach dem Anfärben konnten ihnen Farbbanden zugeordnet werden (Abb. 13). Das Resultat dieser beiden Versuche schien die spezifische Oberflächenmarkierung durch Fluorescamin zu beweisen. Um diese Annahme zu sichern, wurde von Fluorescamin-markierten Zellen eine Trennung der inneren und der äußeren Membran durchgeführt (87). Die äußere Membranfraktion zeigte, wie zu erwarten, das bereits beschriebene (siehe 3.3.1.) Fluoreszenzbandenmuster der Zellhüllenpräparation von markierten Zellen. Das Elektrophoreseprofil der inneren Membran hätte eigentlich keine Fluoreszenzbanden zeigen sollen. Überraschenderweise erschien aber auch in dieser Fraktion die stark fluoreszierende Phosphatidyläthanolaminbande. Die Fluoreszenz war sogar wenigstens doppelt so intensiv wie diejenige der entsprechenden Bande der äußeren Membranfraktion. Nach der Coomassie-Färbung zeigte das Gel die für die Membranfraktionen typischen Bandenmuster (Abb. 14), so daß eine unvollständige Trennung der Membranen nicht der Grund für die intensive Fluoreszenz in der inneren Membran sein konnte. Für die Gegenwart fluoreszierenden Phosphatidyläthanolamins in der

Abb. 13: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen. Fluoreszenzbanden (a) und Bandenmuster (b) nach Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue der periplasmatischen Proteine aus P400-Zellen (siehe 2.3.9., 2.3.10.3. und 3.3.3.; das Photographieren der fluoreszierenden Gele unter UV-Licht hatte ein Verblassen der Fluoreszenz zu Folge; die ursprünglichen Banden fluoreszierten ungefähr 5x so intensiv.

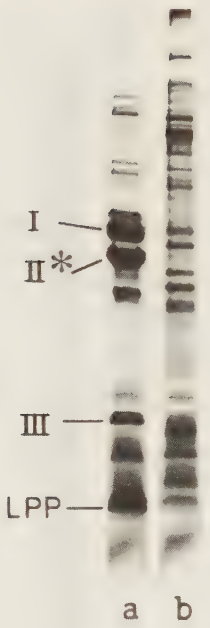

Abb. 14: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen.
Bandenmuster der inneren (b) und äußeren (a) Membran.
LPP Lipoprotein.

Cytoplasmamembran gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnte die Markierung durch die direkte Reaktion von Fluorescamin-Molekülen, die die äußere Membran passiert haben, mit den Phospholipidmolekülen der Cytoplasmamembran zustande gekommen sein. Andererseits könnte das Fluoreszenz-markierte Phosphatidyläthanolamin durch Translokation von der äußeren in die innere Membran gelangt sein; Jones & Osborn (108) haben eine Translokation des Phospholipids von außen nach innen nachgewiesen.

3.3.4. Lokalisierung der Fluoreszenz-Markierung im Protein II*-Molekül

Bei der Klärung der Frage, wo das Protein II* markiert ist, ging es auch darum, als Nebenergebnis eine Aussage zu erhalten, ob die Fluoreszenz-Markierung in der Cytoplasmamembran von eingedrungenem Fluorescamin herrührt oder ob die Translokation fluoreszierenden Phosphatidyläthanolamins dafür verantwortlich sein könnte. Ein Charakteristikum des Proteins II* ist, daß es in Zellhüllen durch Proteasen teilweise abgebaut wird (55). So verbleibt z.B. nach Verdauung mit Trypsin ein 24 000 d-Fragment in der äußeren Membran. Die Ergebnisse der verschiedenen Versuche, wie die Bestimmung der N-terminalen Sequenz mit Hilfe des Edman-Abbaus, die Inaktivierung von Phagen durch das gereinigte ganze Protein und das gereinigte Fragment sowie die Hemmung der Konjugation durch das ganze Protein und das Bruchstück haben gezeigt, daß die nach innen gerichtete C-terminale Region durch Trypsineinwirkung abgespalten wird (55). Dies wurde auch durch Quervernetzungsexperimente bestätigt, da das tryptische Fragment nicht mehr ans Murein vernetzt werden kann.

Um zu zeigen, welcher Abschnitt des Proteins II* durch das Fluorescamin markiert wird, wurden Glasperlenhüllen Fluorescamin-behandelter Zellen tryptisch verdaut und

anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Kontrollansatz, der kein Trypsin enthielt, wurde in gleicher Weise behandelt. Unter UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) war im Elektrophoreseprofil der Kontrolle wie zu erwarten das bereits beschriebene Fluoreszenzbandenmuster Fluorescamin-markierter Glasperlenhüllen (siehe 3.3.1.) zu erkennen. Bei der Trypsin-behandelten Zellhüllpräparation fehlte dagegen die fluoreszierende II*-Bande. Auch im 24 000 d-Bereich des Gels war keine Fluoreszenzbande zu erkennen. Nach dem Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue zeigten sich die typischen Bandenmuster unbehandelter bzw. mit Trypsin behandelter Glasperlenhüllen. Die nach innen gerichtete C-terminale Region des Proteins II* wird demnach durch das Fluorescamin markiert. Das unter Trypsineinwirkung entstandene fluoreszierende Peptid wird wahrscheinlich durch die intensive Fluoreszenzbande des Phosphatidyläthanolamins im niedermolekularen Bereich des Gels überdeckt. Dieser Versuch, der die Frage klären sollte, wo das Protein II* markiert ist, lieferte einen weiteren Hinweis dafür, daß das Fluorescamin die äußere Membran durchdringt.

3.3.5. Das Protein II* als mögliche Eintrittstelle für das Fluorescamin

Nachdem alles darauf hindeutete, daß das Fluorescamin die äußere Membran durchdringt, stellte sich die Frage,

an welcher Stelle und auf welche Weise der Durchtritt durch die äußere Membran erfolgt. Da Permeations-Funktionen der äußeren Membran auch von deren Hauptproteinen erfüllt werden, war es naheliegend anzunehmen, daß auch für die Fluorescamin-Passage ein Hauptprotein verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang nahm das Protein II* eine Sonderstellung ein, da es als einziges Hauptprotein nach der Fluorescamin-Behandlung ganzer Zellen markiert war. Um zu ermitteln, ob der Durchtritt durch die Membran über das Protein II* erfolgt, wurden Zellen des Stammes P400 1.3, dem das Protein fehlt, mit Fluorescamin markiert. Von den markierten Zellen wurde die innere und die äußere Membranfraktion präpariert. Die gelelektrophoretische Analyse zeigte, daß wie im Wildtyp das Phosphatidyläthanolamin in beiden Membranfraktionen Fluoreszenz-markiert war. Die Passage durch die äußere Membran wird also nicht von Protein II* vermittelt.

4. Diskussion

4.1. Das λ-Rezeptorprotein

Die Vorstellung, daß das lam B-Genprodukt und die Proteine Ia und Ib strukturelle Ähnlichkeiten besitzen, bildete die Grundlage für die proteinchemische Charakterisierung des λ-Rezeptorproteins. Die Porenfunktion der drei Proteine und ihre feste, aber nicht kovalente Bindung ans Murein waren die bereits bekannten Eigenschaften (Porenfunktion: 20,67,69,70; nicht kovalente Bindung: 58,78), auf denen die Annahme struktureller Gemeinsamkeiten beruhte. Daneben stellte sich bei der Ausarbeitung eines Verfahrens für die Isolierung des λ-Rezeptorproteins heraus, daß auch dieses Protein wie die Proteine Ia und Ib (39,58) als Murein-Protein-Komplex vollständig resistent gegenüber proteolytischem Abbau (Trypsin, Pronase) ist. Die proteinchemischen Untersuchungen des lam B-Proteins lieferten folgende Daten: Die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe einer SDS-PAGE unter Verwendung von Standardproteinen ergab einen Wert von 47 000. Eine gesicherte Aussage über das Molekulargewicht allein auf der Grundlage der elektrophoretischen Molekulargewichtsbestimmung ist nicht möglich, da manche Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen eine anormale elektrophoretische Beweglichkeit zeigen. Auf der Basis von Histidin oder Methionin, den Aminosäuren mit dem kleinsten molaren Anteil, wurde

daher das minimale chemische Molekulargewicht ermittelt. Der errechnete Wert von 8000 steht nicht im Widerspruch zum elektrophoretisch bestimmten, der ungefähr sechsmal so groß ist wie der Minimalwert. Diese Größenordnung des Molekulargewichts konnte durch vollständigen tryptischen Abbau des isolierten λ-Rezeptorproteins und durch anschließende Trennung der Peptide mit Hilfe der Fingerprinttechnik bestätigt werden. Das Auffinden von 35 Peptiden neben dem intensiv gefärbten Startfleck paßt gut zu der Aminosäurezusammensetzung, die auf der Basis des elektrophoretischen Molekulargewichts errechnet worden war. Außerdem wurde eine einheitliche N-terminale Sequenz gefunden. Die in dieser Arbeit ermittelten proteinchemischen Daten des lam B-Genprodukts, das Molekulargewicht, die Aminosäurezusammensetzung, die Anzahl der tryptischen Peptide und das Auffinden einer einzigen N-terminalen Sequenz, lassen praktisch keine Zweifel daran, daß das Protein in der äußeren Membran als eine Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 47 000 vorliegt. Die Aminosäureanalysen Perameisensäure-oxidierten Materials gaben keinen Anhalt für das Vorliegen von Cysteinsäure. Kühl (99) hatte jedoch das durch Disulfidbrückenbindungen entstandene Dimer als kleinste Einheit mit Phagenrezeptoraktivität beschrieben. Daher wurde versucht, das Protein mit [1-^{14}C] Jodacetamid zu alkylieren. Die erfolglose Präparation radioaktiven Proteins deutet ebenfalls darauf hin, daß das λ-Rezeptor-

protein kein Cystein enthält.

4.2. Vergleich des λ-Rezeptorproteins mit den Proteinen Ia/Ib

Vergleicht man die gefundenen Daten des Iam B-Proteins mit den bisher bekannten (58,63,100) der Proteine Ia/Ib, so ergeben sich hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung beträchtliche Unterschiede (Tab. 6). Weiterhin weisen auch die untereinander sehr ähnlichen N-terminalen Sequenzen der Proteine Ia/Ib gegenüber dem λ-Rezeptorprotein keine Übereinstimmungen von Aminosäureresten in den ersten sieben Positionen auf (Tab. 7). Allerdings haben die ersten drei N-terminalen Aminosäuren der drei Proteine den gleichen chemischen Charakter:

- die N-terminale Position nehmen hydrophobe Aminosäuren ein;
- an der zweiten Stelle stehen Aminosäuren, die bei physiologischem pH-Wert eine negative Ladung besitzen;
- die Aminosäuren, die die dritte Position des N-Terminus einnehmen, weisen wiederum hydrophoben Charakter auf.

Auch das Fleckenmuster der tryptischen Peptide des Iam B-Proteins weist überhaupt keine Ähnlichkeiten mit den bekannten (109) tryptischen "Fingerprints" der

Tabelle 6: Aminosäurezusammensetzung des lam B-Proteins und der Proteine Ia/Ib.

	Aminosäurereste im Polypeptid		
	lam B (Mole/47 kd)	Ia(63) (Mole/36.5 kd)	Ib(63) (Mole/36.5 kd)
Lysin	25	16.1	11.4
Histidin	6-7	1.2	1.0
Arginin	15	11.0	12.2
Asparaginsäure	70	54.6	57.8
Threonin	24	21.6	22.2
Serin	23	15.8	15.5
Glutaminsäure	43	26.9	29.7
Prolin	11	5.7	2.8
Glycin	65	47.9	48.4
Alanin	36	28.3	22.7
Cystein	<0.1	0.11	0.21
Valin	36	22.4	19.4
Methionin	5-6	3.5	3.3
Isoleucin	24	11.9	9.3
Leucin	29	20.7	20.6
Tyrosin	13	26.3	26.0
Phenylalanin	23	18.8	18.3
Tryptophan	16	n.b.[a)]	n.b.[a)]

[a)] nicht bestimmt

Tabelle 7: N-terminale Sequenzen des lam B-Proteins und der Proteine Ia und Ib.

Protein	(E.coli-Stamm)	Sequenz
lam B	(HfrG6, K-12)	Val-Asp-Phe-X-Gly-Tyr-Ala-
Ia	(YA21, K-12)[a)]	Ala-Glu-Val-Tyr-Asn-Lys-Asp
Ib	(YA21, K-12)[a)]	Ala-Glu-Ile- Tyr-Asn-Lys-Asp-

[a)] aus (63)

Proteine Ia und Ib auf. Der Vergleich des Rezeptorproteins mit den Proteinen Ia/Ib auf proteinchemischer Ebene zeigt, daß die Primärstruktur des λ-Rezeptors von den sehr ähnlichen Sequenzen der beiden anderen Proteine weitgehend verschieden sein muß. Da die Proteine einige gemeinsame Eigenschaften besitzen (die Verankerung am Murein, die Resistenz gegenüber Proteasen als Protein-Murein-Komplex und die Porenfunktion), scheint ihre dreidimensionale Struktur dennoch ganz ähnlich zu sein. Trotz sehr verschiedener Sequenzen hat die Zelle offenbar ein ziemlich gleiches Resultat erreicht. Da die Unterschiede in der Primärstruktur zwischen dem λ-Rezeptor und den Proteinen Ia/Ib beträchtlich sind, ist es nicht sehr wahrscheinlich, daß sich die Proteine durch Genduplikation eines ursprünglichen Gens und nachfolgenden Mutationen in den Schwestergenen entwickelt haben.

4.3. Nachbarschaftsbeziehungen in der äußeren Membran

Die Verwendung von Quervernetzungsreagenzien hat sich zu einer gebräuchlichen Methode entwickelt, um Erkenntnisse über Mehrkomponenten-Systeme zu gewinnen (110). Auch die Architektur der äußeren Membran von E.coli wurde mit Hilfe dieser Verbindungen untersucht. Seit den früheren Versuchen, die gezeigt hatten, daß ausgiebige Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Membran vorkommen (74), ist es durch die Entwicklung spaltbarer Quervernetzer möglich geworden, detailierte Kenntnisse über Nachbarschaftsbeziehungen in ihr zu erhalten. Palva & Randall (75,77) studierten die Anordnung von Protein I in der äußeren Membran. Sie fanden, daß das Protein offenbar vorwiegend als Trimeres in der Membran vorliegt. Reithmeier & Bragg (76) beschränkten sich bei ihren Quervernetzungsstudien nicht auf ein Hauptprotein, sondern untersuchten die Wechselwirkung zwischen mehreren Proteinen der äußeren Membran; Sie zeigten wie Palva & Randall, daß die Proteine Ia/Ib zu Dimeren und Trimeren vernetzt werden können. Daneben beobachteten sie, daß weder eine Verknüpfung der Proteine mit dem Murein noch mit anderen Proteinen möglich ist. Sie schlossen weiterhin aus der Vernetzung von Protein II* mit anderen II*-Molekülen, daß viele Exemplare des Proteins in der Membran nahe beieinander stehen. Durch die Behandlung mit Quervernetzer werden außerdem ein Dimeres und ein Trimeres des Lipoproteins gebildet. Weiterhin zeigten die

Autoren, daß sowohl das Protein II* als auch die freie Form des Lipoproteins direkt oder über die gebundene Form des Lipoproteins ans Murein verknüpft werden kann. Außerdem wiesen sie nach, daß die beiden Proteine miteinander vernetzt werden können. Ob das Protein II* und die freie Form des Lipoproteins direkt mit dem Murein bzw. mit der ans Murein gebundenen Form des Lipoproteins in Beziehung treten oder ob eines der Proteine indirekt über das andere Protein verknüpft wird, konnten sie auf Grund ihrer Ergebnisse allerdings nicht entscheiden. Es ist jedoch fraglich, ob es sich bei den beschriebenen Wechselwirkungen um echte Protein-Nachbarschaftsverhältnisse handelt, da die Autoren keine Aussagen über eine Beteiligung des Phospholipids oder/und des LPS an den Wechselwirkungen machten. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Vernetzungsexperimenten wurden die Nicht-Proteinkomponenten in die Betrachtung der Nachbarschaftsbeziehungen mit einbezogen. Weiterhin war es durch die Verwendung von Mutanten, denen jeweils eines der Hauptproteine fehlte, möglich, die Anordnung der Proteine in der Abwesenheit eines potentiellen Vernetzungspartners zu untersuchen. Die Tab. 4 zeigt für den Wildtyp-Stamm und seine Lipoprotein-Mutante die durch gelelektrophoretische Analyse ermittelte Verteilung der Hauptproteine auf die löslichen und die Murein-gebundenen Fraktionen, welche durch Extraktion mit einer SDS-Pufferlösung aus den quervernetzten Glas-

perlenhüllen der beiden Stämme gewonnen worden waren. In einem Punkt entsprechen die in der Tabelle zusammengefaßten Daten nicht den Ergebnissen von Reithmeier & Bragg, die gefunden hatten, daß die Proteine Ia/Ib nicht mit anderen Proteinen in Beziehung treten. Das von der Gegenwart des Lipoproteins abhängige Vorhandensein dieser Proteine in der Murein-gebundenen Fraktion deutet aber darauf hin, daß sie mit dem Lipoprotein wechselwirken. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen, die Demartini & Inouye (111) bei der Extraktion von Zellhüllen mit 2% SDS unter Zusatz verschiedener Natriumchloridmengen gemacht haben. Sie zeigten, daß die Proteine Ia/Ib sowie die freie und die gebundene Form des Lipoproteins mit dem Murein einen Komplex bilden und daß die Affinitäten der Proteine Ia/Ib und des freien Lipoproteins zum Murein im selben Maße abnehmen, wenn die Natriumchloridkonzentration in der SDS-Extraktionslösung ansteigt. Weiterhin ist auf Grund der in der Tabelle aufgeführten Verteilung der Hauptproteine eine Ergänzung der Aussagen von Reithmeier & Bragg möglich. Das Protein II* geht auch bei Abwesenheit des Lipoproteins in die Murein-gebundene Fraktion. Außerdem zeigte die Vernetzung von Glasperlenhüllen des Stammes P400 1.3, dem das Protein II* fehlt, daß die freie Form des Lipoproteins bei Abwesenheit des Proteins II* direkt oder über seine gebundene Form mit dem Murein wechselwirkt. Eine indirekte Verknüpfung der beiden Proteine ans Murein über das jeweils andere

ist daher offenbar nicht verwirklicht. Darüber hinaus zeigten die mit Hilfe der bereits beschriebenen Methodik erhaltenen Membranfraktionen aus den Mutanten des P 400-Wildtypstammes, denen jeweils ein Hauptprotein fehlt (P 530:Proteine Ia/Ib; P 400 1.3:Protein II*), bezüglich der Verteilung der Hauptproteine zu den vorangehend diskutierten Ergebnissen keine wesentlichen Unterschiede. Allerdings trat das jeweils vorhandene Protein der Mutanten im Vergleich zum ebenfalls untersuchten P 400-Wildtyp verstärkt in der Murein-gebundenen Fraktion auf. Dieser Effekt kann zum einen durch eine Umstrukturierung der äußeren Membran durch den Verlust einer mengenmäßig bedeutenden Hüllkomponente und dem damit verbundenen besseren Zugang des Quervernetzers, zu den reaktiven Gruppen erklärt werden. Andererseits könnte das Phänomen, daß das Fehlen eines Hauptproteins durch die verstärkte Produktion eines anderen kompensiert wird (112) der Grund für den oben beschriebenen Effekt sein. Natürlich kann auch eine Kobination von Umstrukturierung und Mehrproduktion für die bevorzugte Verteilung des verbliebenen Proteins auf die Murein-gebundene Fraktion verantwortlich sein. Die aufgezeigten Nachbarschaftsbeziehungen stützen sich auf SDS-PAGEs unter reduktiven Bedingungen der aus quervernetzten Glasperlenhüllen verschiedener Stämme präparierten löslichen bzw. Murein-gebundenen Fraktion. Durch diese Art der Analyse können keine Aussagen über die mögliche

Beteiligung der Nicht-Proteinkomponenten der äußeren Membran, des Phospholipids sowie des LPS an den Wechselwirkungen gemacht werden. Um sicher zu sein, daß es sich bei den gefundenen Protein-Protein- bzw. Protein-Murein-Anordnungen um echte Nachbarschaftsverhältnisse handelt, wurde der Phospholipid- und der LPS-Gehalt der Fraktionen bestimmt. Da das Protein II* der einzige Proteinbestandteil der Murein-gebundenen Fraktion der lpo-Mutante ist, war es nach einer Proteinbestimmung möglich, das Verhältnis aller Komponenten in der Fraktion zu berechnen. Die Relation von 11 Molekülen II* zu 6 Molekülen Phospholipid zu 1 Molekül LPS beweist eindeutig, daß weder über das Phospholipid noch über das LPS das gesamte Protein II* ans Murein verknüpft werden kann. Eine Beteiligung der beiden Nicht-Proteinkomponenten an der Protein II*-Murein-Verknüpfung sowie an dem Komplex der freien Form des Lipoproteins mit dem Murein in der entsprechenden Fraktion des Wildtyps ist ebenfalls nicht realistisch, da der Proteinanteil durch die Gegenwart des Lipoproteins sehr erheblich ansteigt. Eine Berechnung des Verhältnisses auf molekularer Ebene ist auf Grund der heterogenen Proteinzusammensetzung der Fraktion nicht möglich. Jedoch liegen die absoluten Werte der Fraktion bis auf den höheren Proteingehalt in derselben Größenordnung wie in der Fraktion der lpo-Mutante, so daß diese Schlußfolgerung gerechtfertigt ist. Allein für die Protein Ia/Ib-Lipoprotein-Murein-Beziehung kann eine Mitwirkung

des Phospholipids oder/und des LPS nicht ausgeschlossen werden, da nur ein geringer Teil der Proteine Ia/Ib vernetzt wird.

4.4. Die transmembrane Anordnung des Proteins II*

Die direkte Verknüpfung des Proteins II* ans Murein wurde mit Lysin-auxotrophen Zellen der lpo-Mutante nachgewiesen. Aus quervernetzten Glasperlenhüllen dieser Zellen, deren Murein mit [^{3}H]-Diaminopimelinsäure markiert war, wurde die Murein-gebundene Fraktion präpariert. Dieses Material wurde mit Lysozym verdaut und anschließend elektrophoretisch analysiert. Die radioaktiven Muropeptide konnten in der Protein II*-Bande und in zwei distinkten, gefärbten Bereichen der höher molekularen Region des Gels, die wahrscheinlich dem Dimer und höheren Aggregaten des Proteins II* entsprachen, nachgewiesen werden. Nach dem Abbau mit Lysozym wanderten die entstandenen Muropeptide auf Grund ihrer Verknüpfung über das Quervernetzermolekül mit dem Protein II* bis zu den entsprechenden Positionen auf dem Gel. Das Protein II* ist folglich direkt ans Murein gebunden.

Ein Teil des Proteins II* ist wie seine Funktion als Phagenrezeptor zeigt (29,34) an der Außenseite der Bakterienzelle lokalisiert. Außerdem können Mutanten, denen das Protein fehlt, nur schlecht als Rezipienten

beim Konjugationsvorgang fungieren (56). Die Schlußfolgerung aus diesen Ergebnissen und der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen direkten Verknüpfung des Proteins II* ans Murein ist die transmembrane Anordnung des Proteins. Unlängst wurde vorgeschlagen (113), daß das Protein II* an der Diffusion von Aminosäuren durch die äußere Membran beteiligt sein könne. Diese mögliche Funktion des Proteins steht im Einklang mit dem aufgefundenen Arrangement in der äußeren Membran.

4.5. Die Fluorescamin-Markierungsversuche

Mit dem Fluorescamin, einem fluorogenem Reagenz, das mit primären Aminogruppen reagiert, sollte auf Grund seiner hohen Reaktivität und seiner schnellen Hydrolyse eine oberflächenspezifische Markierung der äußeren Membran möglich sein. Hawkes et al. (114) beschrieben für Fibroblasten aus Hühnerembryonen die spezifische Markierung an der Zelloberfläche gelegener Polypeptide und Phospholipide durch die Behandlung der ganzen Zellen mit Fluorescamin. Außerdem ließ der lipophile Charakter des Fluorescamins seine Permeation durch die äußere Membran äußerst unwahrscheinlich erscheinen, da nach Nikaido (19) die äußere Membran für solche Verbindungen praktisch impermeabel ist. Mit Hilfe von Markierungsversuchen sollte die Frage geklärt werden, ob Phospholipid auch an der Zelloberfläche vor-

handen ist. Weiterhin wurde erhofft, mit dem fluorogenen Reagenz Aussagen über die Oberflächenlokalisation der Hauptproteine und eventuell auch die anderer Polypeptide zu erhalten. Die unter der Annahme der Oberflächenspezifität des Fluorescamins durchgeführte Markierung von ganzen Zellen zeigte, daß offenbar das Protein II* und eine niedermolekulare Verbindung primäre Aminogruppen besitzen, die an der Außenseite der Membran liegen. Die Identifizierung der intensiv fluoreszierenden niedermolekularen Verbindung als Phosphatidyläthanolamin erschien zunächst als erfreulicher Befund, da er als nahezu eindeutiger Nachweis für die Existenz von Phospholipid am Zelläußeren gedeutet wurde, entgegen dem Vorschlag von Smit et al. (38), daß die Phospholipidmoleküle in der inneren Hälfte der äußeren Membran lokalisiert sind. Um das Ergebnis des Markierungsversuchs abzusichern, mußte experimentell überprüft werden, ob das Fluorescamin tatsächlich nur die Zelloberfläche markiert. Nach der Behandlung intakter Zellen mit dem Reagenz wurden daher aus diesen die periplasmatischen Proteine isoliert. Keines der Proteine zeigte nach Auftrennung der periplasmatischen Fraktion durch SDS-PAGE Fluoreszenz. Zur Kontrolle wurden die isolierten Proteine mit Fluorescamin markiert. Nach gelelektrophoretischer Analyse der Fraktion fluoreszierten erwartungsgemäß praktisch alle Proteine. Im Gegensatz zu diesen Versuchen, die die spezifische Markierung der Zelloberfläche fast zu beweisen schienen, stand der Nachweis Fluoreszenz-markierten Phosphatidyl-

äthanolamins in der Cytoplasmamembran durch Auftrennung der Membranen von Fluorescamin-markierten Zellen. Präparationsartefakte konnten als Ursache für das Auffinden fluoreszierenden Phosphatidyläthanolamins in der inneren Membran ausgeschlossen werden, da nach dem Färben des Gels die typischen Bandenmuster der beiden Membranfraktionen zu erkennen waren. Nach (115) kommt es außerdem bei der verwendeten Auftrennungsmethode nicht zu einer Hybridisierung der inneren und äußeren Membran. Die Markierung könnte zum einen von Fluorescamin-Molekülen, die die äußere Membran passieren, herrühren, andererseits könnte die Translokation markierten Phosphatidyläthanolamins der Grund für das fluoreszierende Phospholipid in der Cytoplasmamembran sein. Jones & Osborn (108) haben die Reversibilität der Phospholipidtranslokation zwischen innerer und äußerer Membran beschrieben. Neben der Klärung, der schon an sich interessanten Frage, welcher Teil des Proteins II* die Fluoreszenz-Markierung trägt, sollte die Untersuchung dieses Problems einen Anhaltspunkt geben, ob der Fluorescamin-Durchtritt durch die äußere Membran oder die Translokation fluoreszierenden Phosphatidyläthanolamins für die Markierung der inneren Membran verantwortlich ist. Da nach Trypsinbehandlung von Zellhüllen ein auf der Innenseite der äußeren Membran gelegenes C-terminales Fragment vom Protein II* abgespalten wird (55), wurde durch tryptische Verdauung von Glasperlenhüllen Fluorescamin-behandelter Zellen unter-

sucht, wo die Markierung am Protein sitzt. Die Lokalisierung der Fluoreszenz im C-terminalen Bereich des Proteins sprach für das Eindringen des Fluorescamin in die äußere Membran. Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, wo und auf welche Weise das Fluorescamin die Membran durchdringt. Zum Versuch der Klärung dieses Fragenkomplexes wurde im Rahmen dieser Arbeit nur ein Experiment ausgeführt. Da Hauptproteine der äußeren Membran auch Porenfunktionen erfüllen (20, 67, 69, 70, 113), lag die Vermutung nahe, daß der Eintritt des Fluorescamins über eines von ihnen erfolgt. Die Markierung des Proteins II* ließ daran denken, daß dieses mit der Passage etwas zu tun haben könnte. Zellen einer Mutante, der das Protein fehlte, wurden daher markiert, die beiden Membranfraktionen aufgetrennt und gelelektrophoretisch analysiert. Auch in diesem Fall war aber das Phosphatidyläthanolamin der inneren Membran markiert. Dieses negative Ergebnis, daß das Protein II* nicht an der Fluorescamin-Passage beteiligt ist, ließ vermuten, daß eine kurzfristige Lösung der Frage nach dem Weg des Reagenzes zur Plasmamembran nicht zu erreichen war. Einen Hinweis, daß möglicherweise die Lipidphase der Membran beim Durchtritt eine Rolle spielt, lieferten die von Cross & Briggs (116) durchgeführten Fluorescamin-Markierungsversuche von Erythrozyten- und Kornmembranen. Die Autoren schlossen aus ihren Untersuchungen, daß das Fluorescamin eine hohe Affinität für Membranen besitzt. Die Annahme, daß sich das Fluorescamin als lipophile Substanz bevorzugt in

der lipophilen Membranstruktur verteilt, wird nach ihrer Meinung dadurch unterstützt, daß sie ähnliche Markierungsmuster fanden, ganz gleich, ob sie die Markierung vor oder nach dem Homogenisieren der Erythrozyten und des Korngewebes durchführten. Die Vorstellung, daß sich das Fluorescamin präferentiell in der Membranphase verteilt, liefert eine Erklärungsmöglichkeit für den scheinbaren Widerspruch, daß die weiter außen liegenden periplasmatischen Proteine von außen nicht markiert werden, während das Phosphatidyläthanolamin der Cytoplasmamembran fluoresziert. Der periplasmatische Raum könnte zudem durch die von Bayer beschriebenen Adhäsionsstellen (5) überbrückt werden, so daß sich das Fluorescamin immer in der von ihm bevorzugten Lipidphase befindet. Die Annahme, daß das Fluorescamin eine besondere Affinität für Membranen besitzt, kann aber nicht ohne weiteres auf die äußere Membran übertragen werden, da sie nach Nikaido (19) für lipophile Substanzen impermeabel ist, was ja für biologische Membranen ein ungewöhnliches Verhalten darstellt. Die Ergebnisse von Hawkes et al. (114), daß intrazelluläre, lösliche Enzyme nach Fluorescamin-Behandlung der ganzen Zellen keine Fluoreszenz-Markierung zeigen, können, wie die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, mit den periplasmatischen Proteinen auch durch die hohe Affinität des Reagenzes für lipophile Strukturen erklärt werden.

5. Zusammenfassung

Charakterisierung des λ-Rezeptorproteins

Aus Escherichia coli wurde das lam B-Protein isoliert. Im Verlauf der Isolierung konnte gezeigt werden, daß es in Verbindung mit dem Murein gegenüber Proteasen resistent ist. Durch Aminosäureanalyse, Alkylierung mit Jod [1-^{14}C]-Acetamid, tryptischem Fingerprint und Bestimmung der N-terminalen Sequenz wurde das Protein charakterisiert. Das auf der Basis von Histidin oder Methionin errechnete minimale chemische Molekulargewicht von 8000 steht nicht im Widerspruch zum elektrophoretisch ermittelten Molekulargewicht von 47 000. Die Zahl der tryptischen Peptide bestätigt in etwa die auf der Grundlage der elektrophoretischen Molekulargewichtsbestimmung errechnete Aminosäurezusammensetzung. Die Schlußfolgerung aus diesen Ergebnissen und dem Auffinden einer einzigen N-terminalen Sequenz war, daß das λ-Rezeptorprotein als eine Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 47 000 in der äußeren Membran vorkommt. Außerdem enthält es kein Cystein wie die Aminosäureanalysedaten und seine erfolglose Alkylierung übereinstimmend zeigten. Ein Vergleich auf der Basis der Aminosäureanalysedaten und der N-terminalen Sequenzen ergab, daß die Primärsturkturen der Proteine Ia/Ib gegenüber der des λ-Rezeptors keine großen Ähnlichkeiten aufweisen.

Untersuchung der Struktur der äußeren Membran mit Hilfe von Quervernetzung

Die räumliche Anordnung der Hauptproteine in der äußeren Membran wurde durch Quervernetzungsversuche mit dem spaltbaren Reagenz Dithiobis (Succinimidyl Propionat) studiert. Die Experimente wurden mit verschiedenen Mutanten, denen jeweils ein Hauptprotein fehlte, und den entsprechenden Wildtypzellen durchgeführt. Die nach Extraktion mit heißer SDS-Pufferlösung aus quervernetzten Glasperlenhüllen der Stämme erhaltenen löslichen und Murein-gebundenen Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-PAGEs analysiert. Folgende Wechselwirkungen konnten aus der Verteilung der Hauptproteine auf die Fraktionen abgeleitet werden:

- Der größte Teil des Proteins II* wird unabhängig von anderen Proteinen ans Murein vernetzt.
- Dasselbe gilt für die freie Form des Lipoproteins, allerdings bleibt ungeklärt, ob es direkt oder über seine gebundene Form ans Murein verknüpft wird.
- Eine kleine Menge der Proteine Ia/Ib wird über das Lipoprotein ans Murein gebunden.

Um abzusichern, daß es sich um echte Protein-Murein- bzw. Protein-Protein-Nachbarschaftsbeziehungen handelt, wurde der Phospholipid- und der LPS-Gehalt in den Fraktionen bestimmt. Mit Ausnahme der Wechselwirkung der Proteine Ia/Ib mit dem Lipoprotein, bei der eine Mitwirkung des Phospholipids oder/und des LPS auf Grund der geringen Menge der involvierten Ia/Ib-Moleküle

möglich ist, sprachen die erhaltenen Relationen gegen eine Beteiligung der beiden Nicht-Proteinkomponenten an den Nachbarschaftsbeziehungen. Die gelelektrophoretische Analyse der Lysozym-behandelten, Murein-gebundenen Fraktion aus Lysin-auxotrophen Zellen, denen das Lipoprotein fehlte und deren Murein mit [^{3}H]-Diaminopimelinsäure spezifisch markiert worden war, ergab, daß das Protein II* direkt ans Murein verknüpft wird. Aus seiner direkten Wechselwirkung mit dem Murein und seiner bereits bekannten Phagenrezeptorfunktion (29,34) wurde der Schluß gezogen, daß das Protein II* ein Transmembran-Polypeptid darstellt.

Fluorescamin-Markierungsexperimente zur Klärung der Membranarchitektur

Durch Fluorescamin-Markierung ganzer Zellen sollte die Verteilung des Phospholipids in der äußeren Membran geklärt werden. Daneben bestand die Hoffnung, daß auf Grund der Versuche Aussagen über die Oberflächenlokalisation der Polypeptide der Membran gemacht werden können. Die zwei fluoreszierenden Komponenten, die das Elektrophoreseprofil von Glasperlenhüllen Fluorescamin-behandelter Zellen zeigte, konnten als Protein II* und Phosphatidyläthanolamin identifiziert werden. Eine Überprüfung der Oberflächenspezifität des Fluorescamins ergab, daß die aus markierten Zellen isolierten periplasmatischen Proteine nicht fluoreszierten, während

das Phosphatidyläthanolamin der inneren Membran, die durch Auftrennung der Membranen von Fluorescamin-behandelten Zellen gewonnen worden war, intensive Fluoreszenz-Markierung aufwies. Diese konnte von der direkten Reaktion eingedrungenen Fluorescamins mit dem Phospholipid der Plasmamembran herrühren oder ihren Grund in der Translokation markierten Phosphatidyläthanolamins von der äußeren zur inneren Membran haben. Durch tryptische Verdauung von Glasperlenhüllen aus markierten Zellen wurde nachgewiesen, daß das Protein II* an seinem innen gelegenen C-terminalen Abschnitt markiert wird. Dies war ein Hinweis dafür, daß das Fluorescamin in die Membran eindringt. Die gelelektrophoretische Analyse der Membranfraktionen aus markierten Mutantenzellen, denen das Protein II* fehlte, zeigte, daß das Protein selbst nicht für die Fluorescamin-Passage verantwortlich ist. Die Fluorescamin-Markierung der inneren Membran stand nicht im Widerspruch zum Fehlen der Fluoreszenz in der periplasmatischen Fraktion, da der periplasmatische Raum durch die von Bayer beschriebenen Adhäsionsstellen (5) überbrückt wird. Die Resultate von Cross & Briggs (116), daß nämlich das lipophile Fluorescamin eine höhere Affinität für Membranen als etwa für wasserlösliche Proteine besitzt, unterstützen diese Deutung.

6. Literaturverzeichnis

1. De Petris, S. (1967) J.Ultrastruct.Res. 19, 45
2. Nanninga, N. (1970) J.Bacteriol. 101, 297
3. Braun, V. & Hantke, K. (1974) Ann.Rev.Biochem. 43, 89
4. Heppel, L.A. (1971) in Structure and Function of Biological Membranes (Herausgeber: L.I. Rothfield), Academic Press, New York, S. 224-247
5. Bayer, M.E. (1968) J.Gen.Microbiol. 53, 395
6. Miura, T. & Mizushima, S. (1968) Biochim. Biophys. Acta 193, 268
7. Fox, C.F., Law, J.H., Tsugagoshi, N. & Wilson, G. (1970) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 67, 598
8. Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E. & Carson, J. (1972) J.Biol.Chem. 247, 3962
9. Bell, R.M., Mavis, R.O., Osborn, M.J. & Vagelos, P.R. (1971) Biochem.Biophys.Acta 249, 628
10. White, D.A., Albright, F.R., Lennarz, W.J. & Schnaitman, C.A. (1971) Biochem.Biophys.Acta 249, 636
11. Ghuysen, J.M. & Shockman, G.D. (1973) in Bacterial Membranes and Walls (Herausgeber: L. Leive), Marcel Dekker, New York, Bd. 1, S. 37-130
12. Osborn, M.J., Gander, J.E. & Parisi, E. (1972) J.Biol. Chem. 247, 3973
13. Singer, S.J. & Nicolson, G.L. (1972) Science 175, 720
14. Osborn, M.J. (1969) Ann.Rev.Biochem. 38, 501
15. Ghuysen, J.M. (1977) in The Synthesis, Assembly and Turnover of Cell Surface Components (Herausgeber:

G. Poste & G.L. Nicolson) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, S. 463-595

16. Payne, J.W. & Gilvarg, C. (1968) J.Biol.Chem. 243, 6291
17. Decad, M., Nakae, T. & Nikaido, H. (1974) Fed. Proc. 33, 1240
18. Nakae, T. & Nikaido, H. (1975) J.Biol.Chem. 250, 7359
19. Nikaido, H. (1976) Biochem.Biophys.Acta 433, 118
20. Bavoil, P., Nikaido, H. & von Meyenburg, K. (1977) Molec.gen.Genet. 158, 23
21. Lutkenhaus, J.F. (1977) J.Bacteriol. 131, 631
22. Pugsley, A.P. & Reeves, P. (1976) J.Bacteriol. 126, 1052
23. Hancock, R.E., Hantke, K. & Braun, V. (1976) J.Bacteriol. 127, 1370
24. Di Masi, D.R., White, J.C., Schnaitman, C.A. & Bradbeer, C. (1973) J.Bacteriol. 115, 506
25. Bradbeer, C., Woodrow, M.L. & Khalifak, L.I. (1976) J.Bacteriol. 125, 1032
26. Szmelcman, S. & Hofnung, M. (1975) J.Bacteriol. 124, 112
27. Braun, V. & Krieger-Brauer, H.J. (1977) Biochim.Biophys. Acta 469, 89
28. Randall-Hazelbauer, L. & Schwartz, M. (1973) J.Bacteriol. 116, 1436
29. Datta, D.B., Arden, B. & Henning, U. (1977) J.Bacteriol. 131, 821
30. Chai, T.J. & Foulds, J. (1978) J.Bacteriol. 135, 164
31. Sabet, S.F. & Schnaitman, C.A. (1971) J.Bacteriol. 108, 442

32. Torti, S.V. & Park, J.T. (1976) Nature 263, 323

33. Fung, J., MacAlister, T.J. & Rothfield, L.I. (1978) J.Bacteriol. 133, 1467

34. van Alphen, L., Havekes, L. & Lugtenberg, B. (1977) FEBS Lett. 75, 285

35. Schweizer, M. & Henning, U. (1977) J.Bacteriol. 129, 1651

36. Inouye, H. & Beckwith, J. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 1440

37. Schweizer, M., Schwarz, H., Sonntag, I. & Henning, U. (1976) Biochem.Biophys.Acta 448, 474

38. Smit, J., Kamio, Y. & Nikaido, H. (1975) J.Bacteriol. 124, 942

39. Henning, U., Höhn, B. & Sonntag, I. (1973) Eur.J. Biochem. 39, 27

40. Schmitges, C.F. & Henning, U. (1976) Eur.J.Biochem. 63, 47

41. Di Rienzo, J.M., Nakamura, K. & Inouye, M. (1978) Ann.Rev.Biochem. 47, 481

42. Braun, V. & Bosch, V. (1972) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 69, 970

43. Hantke, K. & Braun, V. (1973) Eur.J.Biochem. 34, 284

44. Braun, V. (1975) Biochem.Biophys.Acta 415, 335

45. Inouye, M., Shaw, J. & Shen, C. (1972) J.Biol.Chem. 247, 8145

46. Hirashima, A., Wu, H.C., Venkateswaran, P.S. & Inouye, M. (1973) J.Biol.Chem. 248, 5645

47. Braun, V., Rehn, K. & Wolff, H. (1970) Biochemistry 9, 5041

48. Inouye, M., Hirashima, A. & Lee, N. (1974) Ann.N.Y. Acad.Sci. 235, 83

49. Braun, V., Bosch, V., Klumpp, E.R., Neff, I., Mayer, A. & Schlecht, S. (1976) Eur.J.Biochem. 62, 555

50. Inouye, S., Lee, N., Inouye, M., Wu, H.C., Suzuki, H., Nishimura, Y., Iketani, H. & Hirota, Y. (1977) J.Bacteriol. 132, 308

51. Hirota, Y., Suzuki, H., Nishimura, Y. & Yasuda, S. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 1417

52. Yem, D.W. & Wu, H.C. (1978) J.Bacteriol. 133, 1419

53. Yamada, H. & Mizushima, S. (1978) J.Bacteriol. 135, 1024

54. Garten, W., Hindennach, I. & Henning, U. (1975) Eur. J. Biochem. 59, 215

55. Schweizer, M., Hindennach, I., Garten, W. & Henning, U. (1978) Eur.J.Biochem. 82, 211

56. Skurray, R.A., Hancock, R.E.W. & Reeves, P. (1974) J.Bacteriol. 119, 726

57. Manning, P.A. & Reeves, P. (1977) J.Bacteriol. 130, 540

58. Rosenbusch, J.P. (1974) J.Biol.Chem. 249, 8019

59. Hasegawa, Y., Yamada, H. & Mizushima, S. (1976) J. Biochem. 80, 1401

60. Ichihara, S. & Mizushima, S. (1977) J.Biochem. 81, 1525

61. Bassford, P.J., Jr., Diedrich, D.L., Schnaitman, C.A. & Reeves, P. (1977) J.Bacteriol. 131, 608

62. Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H. & Berendsen, W. (1976) Molec.gen.Genet. 147, 251

63. Ichihara, S. & Mizushima, S. (1978) J.Biochem. 83, 1095

64. Steven, A.C., ten Heggeler, B., Müller, R., Kistler, J. & Rosenbsuch, J.P. (1977) J.Cell Biol. 72, 292

65. Verhoef, C., De Graff, P.J. & Lugtenberg, B. (1977) Molec.gen.Genet. 150, 103

66. Hantke, K. (1978) Molec.gen.Genet. 164, 131

67. Nakae, T. (1976) Biochem.Biophys.Res.Comm. 71, 877

68. Hofnung, M. (1974) Genetics 76, 169

69. Szmelcman, S., Schwartz, M., Silhavy, T.J. & Boos, W. (1976) Eur.J.Biochem. 65, 13

70. von Meyenburg, K. & Nikaido, H. (1977) Biochem.Biophys. Res.Comm. 78, 1100

71. Mühlradt, P.F. & Golecki, J.R. (1975) Eur.J.Biochem. 51, 343

72. Cronan, J.E., Jr. & Vagelos, P.R. (1972) Biochim.Biophys. Acta 265, 25

73. White, D.A., Lennarz, W.J. & Schnaitman, C.A. (1972) J.Bacteriol. 109, 686

74. Haller, I. & Henning, U. (1974) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71, 2018

75. Palva, E.T. & Randall, L.L. (1976) J.Bacteriol. 127, 1558

76. Reithmeier, R.A.F. & Bragg, P.D. (1977) Biochim.Biophys. Acta 466, 245

77. Palva, E.T. & Randall, L.L. (1978) J.Bacteriol. 133, 279

78. Pugsley, A.P. & Schnaitman, C.A. (1978) J.Bacteriol. 135, 1118

79. Hindennach, I. & Henning, U. (1975) Eur.J.Biochem. 59, 207

80. Hofnung, M., Hatfield, D. & Schwartz, M. (1974) J.Bacteriol. 117, 40

81. Davies, J.K. & Reeves, P. (1975) J.Bacteriol. 123, 102

82. Pittard, J. & Wallace, B.J. (1966) J.Bacteriol. 91, 1494

83. Bachman, B.J., Brooks Low, K. & Taylor, A.L. (1976) Bact.Rev. 40, 116

84. Hirs, C.H.W. (1956) J.Biol.Chem. 219, 611

85. Crestfield, A.M., Moore, S. & Stein, W.H. (1963) J.Biol.Chem. 238, 622

86. Heppel, L.A. (1967) Science 156, 1451

87. Ito, K., Sato, T. & Yura, T. (1977) Cell 11, 551

88. Weber, K. & Osborn, M. (1969) J.Biol.Chem. 244, 4406

89. Studier, W. (1973) J.Mol.Biol. 79, 237

90. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680

91. Houston, L.L. (1971) Anal.Biochem. 44, 81

92. Liu, T.-Y. & Chang, Y.H. (1971) J.Biol.Chem. 246, 2842

93. Garten, W., Hindennach, I., & Henning, U. (1975) Eur.J.Biochem. 60, 303

94. Edman, P. & Henschen, A. (1975) in Protein Sequence Determination (Herausgeber: S.B. Needleman), Springer, Berlin-Heidelberg-New York, S. 232-279

95. Lowry, O.H. Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265

96. Osborn, M.J. (1963) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 50, 499

97. Thirion, J.P. & Hofnung, M. (1972) Genetics 71, 207

98. Sandermann, J., Jr., Bavoil, P. & Nikaido, H. (1978) FEBS Lett. 95, 107

99. Kühl, P.W. (1977) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 268

100. Garten, W. & Henning, U. (1974) Eur.J.Biochem. 47, 343

101. Davies, G.E. & Stark, G.R. (1970) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 66, 651

102. Bragg, P.D. & Hou, C. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 167, 311

103. Sun, T.T., Traut, R.R. & Kahan, L. (1974) J.Mol.Biol. 87, 509

104. Sun, T.T., Bollen, A., Kahan, L. & Traut, R.R. (1974) Biochemistry 13, 2334

105. Wang, K. & Richards, F.M. (1974) J.Biol.Chem. 249, 8005

106. Lomant, A.J. & Fairbanks, G. (1976) J.Mol.Biol. 104, 234

107. Leutgeb, W. & Schwarz, U. (1967) Z.Naturf. 22b, 545

108. Jones, N.C. & Osborn, M.J. (1977) J.Biol.Chem. 252, 7405

109. Henning, U., Schmidmayr, W. & Hindennach, I. (1977) Molec.gen.Genet. 154, 293

110. Peters, K. & Richards, F.M. (1977) Ann.Rev.Biochem. 46, 523

111. De Martini, M. & Inouye, M. (1978) J.Bacteriol. 133, 329

112. Henning, U. & Haller, I. (1975) FEBS Lett. 55, 161

113. Manning, P.A., Pugsley A.P. & Reeves, P. (1977) J.Mol.Biol. 116, 285

114. Hawkes, S.P., Meehan, T.D. & Bissell, M.J. (1976) Biochem.Biophys.Res.Comm. 68, 1226

115. Tsugagoshi, N. & Fox, C.F. (1971) Biochemistry 10, 3309

116. Cross, J.W. & Briggs, W.R. (1977) Biochim.Biophys. Acta 471, 67.

7. Abkürzungen

EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure (Na_2-Salz)
H_2O	entionisiertes Wasser
H_2O dest.	Quarz-destilliertes, entionisiertes Wasser
KDO	2-Keto-3-desoxyoctanoat
LPS	Lipopolysaccharid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SDS	Dodecylsulfat (Na-Salz)
Tris	Tris (hydroxy methyl)-aminomethan

Meine akademischen Lehrer waren:

N. Amrhein, J. Feierabend, P. Fortnagel, U. Hamann,
U. Henning, B. Hock, H.G. Keyl, W. Kirmse, H. Langer,
E. Leistner, H.Ch. Lüttgau, H. Mergner, S. Methfessel,
G. Pfleiderer, W. Rautenberg, A. Redhardt, G. Reißig,
W. Rüger, A. Ruthmann, J. Schwartzkopff, H. Specker,
R.K. Thauer, A. Trebst, U. Winkler, M.H. Zenk.

Lebenslauf

RAINER ENDERMANN

27. März 1953	geboren in Herne/Westf.
1959-1963	Besuch der Josefschule in Lünen-Brambauer
April 1963	Eintritt in das Freiherr-vom-Stein-Gymnasium zu Lünen
Mai 1971	Ablegung der Reifeprüfung an derselben Schule
Wintersemester 1971/72	Immatrikulation für das Fach Biologie mit Diplomabschluß an der Ruhruniversität Bochum
Wintersemester 1976/77	Beendigung des Biologiestudiums in Bochum durch Ablegen der Diplom-Hauptprüfung; mündliche Diplomprüfungen in den Fächern: Botanik (Hauptfach), Mikrobiologie und Biochemie (Nebenfächer); Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: "Proteinkinasen in Chlamydomonas reinhardtii" am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie unter Betreuung von Prof. Dr. N. Amrhein
Mai 1977-November 1978	Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter Anleitung von Prof. Dr. U. Henning am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen

Seit 1975 verheiratet mit Ursula Endermann, geb. Fischer;
2 Kinder im Alter von 3 Jahren und 6 Monaten.